T. 66 AVRIL 1941 N° 4

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

REMARQUES SUR LA BIOLOGIE DE LA POMME DE TERRE

par J. MAGROU.

I. — CULTURE SYMBIOTIQUE DE LA POMME DE TERRE

1. **Historique.** — La Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est originaire de l'Amérique du Sud. Antérieurement à la découverte du Nouveau-Monde, elle était cultivée de temps immémorial par les indigènes de la Cordillère des Andes. Le fait est établi par des documents archéologiques remontant au début de notre ère, et il est certain qu'à cette époque lointaine, la Pomme de terre était déjà connue et cultivée depuis des siècles par les habitants de ces contrées. Sans elle, les populations qui s'étaient établies sur les hauts plateaux de la Bolivie et du Pérou pour y chercher un refuge contre les dangers de la forêt équatoriale, n'auraient pu subsister dans ces régions inhospitalières. Ces indigènes n'ignoraient pas que leur existence même dépendait de la Pomme de terre ; aussi, pour se concilier les esprits et obtenir d'eux de bonnes récoltes, entouraient-ils sa culture de cérémonies rituelles, souvent accompagnées de sacrifices humains (1).

(1) Salaman, 1937.

C'est après la conquête espagnole, dans la seconde moitié du XVI^e^ siècle, que la Pomme de terre fut introduite dans l'Ancien Monde, en Espagne d'abord, puis dans les Iles britanniques. La première mention que l'on en trouve en Europe figure dans les livres de comptes de l'Hôpital du Sang, à Séville, qui signalent, en 1573, l'achat de pommes de terre pour cet établissement. Le roi d'Espagne Philippe II fit don au pape Pie IV de quelques-uns des tubercules récemment importés, dans la pensée que les propriétés toniques qu'on leur attribuait pourraient aider à rétablir la santé du Saint-Père. Celui-ci partagea le présent royal avec un cardinal valétudinaire, à cette époque légat en Belgique, qui, à son tour, fit tenir quelques tubercules à Philippe de Sivry, préfet de Mons, en Hainaut. Ce dernier, en 1588, en envoya deux échantillons au célèbre botaniste français Charles de l'Escluse, dit Clusius, qui se trouvait alors à Vienne, en Autriche. Clusius cultiva la plante et en publia une description détaillée dans son traité intitulé *Rariorum plantarum historia*, paru en 1601. En 1589, il recevait du même Philippe de Sivry une aquarelle représentant un rameau fleuri et deux tubercules de Pomme de terre, précieux document que l'on peut voir au Musée Plantin, à Anvers.

Dès cette époque, la Pomme de terre se répandit dans les Pays-Bas espagnols, en Hollande et en Allemagne. Au XVIII^e^ siècle, Parmentier, pharmacien militaire français, prisonnier de guerre en Allemagne, comprit tout le parti que l'on pouvait tirer de cette plante. De retour en France, il s'employa, avec un zèle d'apôtre, à en propager la culture dans notre pays. Le succès qui couronna ses efforts fut d'une portée incalculable, puisqu'il eut pour résultat la disparition des famines qui désolaient périodiquement nos contrées.

2. **Dégénérescence de la Pomme de terre.** — L'acclimatation de la Pomme de terre en Europe rencontra, dès le début, de sérieuses difficultés. De l'Escluse rapporte que, de son temps, les semis de graines de Pomme de terre donnaient des plantes qui fleurissaient, mais qui ne produisaient pas de tubercules. Plus tard, Parmentier observa ce qu'il appelait la dégénération de la plante : dans des champs entiers, la végétation parais-

sait satisfaisante, mais, à l'arrachage, aucun tubercule n'était récolté (2). De nos jours, des maladies dites de dégénérescence, mosaïque, frisolée, enroulement, bigarrure, qu'il est classique d'attribuer à des virus filtrables, s'observent avec une extrême fréquence. Ces maladies, qui se transmettent d'année en année par les tubercules atteints, se traduisent non seulement par des symptômes affectant le feuillage, mais aussi par une diminution progressive des récoltes qui, à la longue, se trouvent réduites à rien. Elles compromettent gravement l'avenir même de l'espèce.

La propriété de produire des tubercules ne s'est donc pas maintenue sans peine chez la Pomme de terre cultivée. La plante est normalement apte à tubériser, mais, si cette aptitude fait partie de son patrimoine héréditaire, elle semble, dans certains cas, ne se manifester qu'avec le secours de quelque impulsion venue du dehors. Aussi a-t-on cherché à découvrir les facteurs externes capables de provoquer ou de favoriser la tubérisation.

3. **Symbiose et tubérisation.** — Noël Bernard (1902, 1904, 1909) avait démontré que, chez les Orchidées, la formation des tubercules (aussi bien que la germination des graines) est due à des champignons symbiotiques qui s'associent étroitement aux racines pour former des organes composites appelés mycorhizes (du grec μύκης, champignon, ῥίζα, racine). Il pensa qu'il en était de même chez la Pomme de terre, mais, contre son attente, il ne parvint pas à découvrir de mycorhizes chez le *Solanum tuberosum* cultivé. Il en déduisit que la plante devait, dans son pays d'origine, héberger des champignons symbiotiques, mais qu'après sa mise en culture, elle s'était affranchie de la symbiose, par suite de sa transplantation hors de ses stations naturelles, dans des terrains où manquent les champignons capables de s'associer avec elle.

Cette hypothèse fut confirmée par la découverte de mycorhizes parfaitement caractérisées dans un pied de Pomme de terre sauvage (*Solanum maglia* Schlecht.), récolté au Chili

(2) Parmentier, 1786.

dans une station naturelle (M^me^ Noël Bernard et J. Magrou, 1911). Ces mycorhizes, assez différentes de celles des Orchidées, où le champignon forme dans les cellules des pelotons serrés, sont, par contre, de même type que celles que l'on rencontre chez de nombreuses plantes vivaces sauvages. Elles sont caractérisées par la formation, aux dépens du mycélium endophyte, d'*arbuscules* ou suçoirs intracellulaires abondamment et finement ramifiés, et de renflements terminaux ou intercalaires appelés vésicules.

4. **Culture symbiotique de la Pomme de terre.** — Des champignons identiques ont été observés par Noël Bernard (1911) chez la Douce-amère (*Solanum dulcamara* L.), plante vivace sauvage voisine de la Pomme de terre et assez commune dans nos contrées. Si l'on sème des graines de Pomme de terre dans un terrain (non fumé) où croît la Douce-amère, une partie des pieds obtenus contractent la symbiose avec le champignon de cette plante, tandis que d'autres résistent à l'infection. *Or, seules produisent des tubercules les plantes chez lesquelles des mycorhizes se sont formées* (J. Magrou, 1914, 1918, 1921). Il y a donc, dans les conditions de l'expérience, corrélation entre l'adaptation à la symbiose et la tubérisation.

Partant de là, il pouvait sembler indiqué, pour favoriser la production des tubercules, de cultiver la Pomme de terre dans les terrains où la Douce-amère croît spontanément. Mais cette plante n'est pas assez répandue dans la nature pour que la méthode puisse offrir un intérêt pratique. Par contre, il existe des sols où des espèces abondamment pourvues de mycorhizes sont extraordinairement nombreuses : ce sont les terrains des hauts pâturages alpestres (Costantin et Magrou, 1926). D'où l'idée de semer la Pomme de terre dans de tels terrains, avec l'espoir qu'elle pourrait contracter la symbiose avec certains des champignons qui y pullulent. L'expérience, réalisée sur les pentes du Pic du Midi, grâce au précieux concours de M. J. Bouget, s'est montrée concluante ; des graines, semées dans des terres de prairie de cette montagne, ont donné des plantes dont les racines étaient largement envahies par des champignons symbiotiques et qui ont produit, en l'absence de

toute fumure, une récolte abondante de tubercules. Par contre, des semis des mêmes variétés, faits à la même époque en terre de champ ordinaire, à Bagnères-de-Bigorre, n'ont donné aucun tubercule (3).

Les tubercules provenant de ces semis en montagne n'ont pas tardé à se répandre parmi les cultivateurs de la région du Pic du Midi, qui apprécient leurs qualités de productivité et de résistance aux maladies. Aussi la méthode de culture symbiotique de la Pomme de terre, issue de nos expériences publiées en 1914 et en 1934-1935, est-elle aujourd'hui en voie d'application dans la région pyrénéenne. Les semis faits dans ces conditions donnent des rendements remarquables (jusqu'à 64 tubercules pour un pied [Bouget, 1934]) ; ces tubercules « primaires », replantés dans les mêmes terrains à mycorhizes, fournissent en abondance de gros tubercules « secondaires » qui constituent des semences de qualité exceptionnelle ; les maladies à virus ne se transmettant pas par les graines, et les cultures étant faites à grande distance des champs contaminés, ces tubercules ont, en effet, toutes chances d'être indemnes de virus.

5. **Tubérisation asymbiotique en milieux concentrés.** — Les données précédentes soulèvent deux questions : 1° Par quel mécanisme les champignons provoquent-ils la formation des tubercules ? 2° Comment, dans nos champs, les Pommes de terre continuent-elles à tubériser, malgré la disparition de ces champignons ? Les expériences suivantes, sur lesquelles nous reviendrons en détail dans la deuxième partie de ce travail, permettent de répondre à cette double interrogation.

Les champignons symbiotiques attaquent l'amidon qui se trouve en abondance dans les racines ; cette attaque se produit non seulement dans les cellules habitées par l'endophyte, mais aussi, sans soute sous l'action d'une diastase diffusible, dans les cellules du voisinage. Si, en effet, on traite par la solution iodo-iodurée une coupe longitudinale faite dans une racine infestée, on constate que les grains d'amidon font défaut dans

(3) Costantin, Magrou, Bouget et Mlle Jaudel, 1934 ; Costantin, Magrou et Bouget, 1934; Costantin et Magrou, 1935.

les cellules envahies ; on peut en voir, par contre, en dehors de la plage infestée, dans les cellules où le champignon n'a pas encore pénétré, mais ces grains, au lieu de se colorer en bleu par l'iode, prennent, au contact de ce réactif, une teinte brune, indice d'un début de transformation de l'amidon en dextrine. A un stade ultérieur de la décomposition, les grains disparaissent par suite de la transformation du polysaccharide en sucres solubles tels que le maltose ou le glucose. La dislocation de l'amidon en molécules de sucre a pour effet d'augmenter fortement la concentration moléculaire du suc cellulaire. L'augmentation de pression osmotique qui en résulte ne serait-elle pas la cause de la tubérisation ? En ce cas, on devrait pouvoir obtenir des tubercules sans le concours du champignon, en cultivant la Pomme de terre sur des solutions glucosées convenablement concentrées. L'expérience montre qu'il en est bien ainsi.

Des graines de Pommes de terre, désinfectées par l'eau oxygénée, sont semées aseptiquement dans des tubes stérilisés, sur plaques de coton imbibées d'une solution nutritive minérale pure ou renfermant du glucose à diverses concentrations. Dans ces conditions, et en exposant les cultures à une bonne lumière diffuse, on obtient, dans les tubes ne renfermant pas de glucose ou n'en renfermant qu'à faible dose, des plantules feuillées bien développées mais qui ne produisent jamais de tubercules. A partir d'une certaine concentration en glucose, il se forme de petits tubercules de structure normale. A des concentrations plus fortes, la formation des tubercules est à la fois plus précoce et plus abondante (Magrou, 1938) [fig. 1]. On arrive au même résultat si l'on substitue au glucose, à doses équimoléculaires, d'autres composés organiques tels que la glycérine (Magrou, 1939 $_1$) ou le saccharose (Molliard, 1939).

Dans des conditions d'asepsie rigoureuse, on peut donc obtenir la tubérisation des plants de Pomme de terre issus de graines, à condition de les cultiver sur des milieux nutritifs suffisamment concentrés en produits absorbables par les racines. On s'explique par là que, dans nos champs, les Pommes de terre, bien qu'affranchies de la symbiose, continuent à produire des tubercules, les engrais ayant pour résultat d'accroître la concentration des solutions qui imbibent le sol

où se développe la plante (3 *bis*). Il semble d'ailleurs que, dans les conditions artificielles où elle vit actuellement, l'espèce n'ait pu se maintenir que grâce aux soins culturaux dont elle est

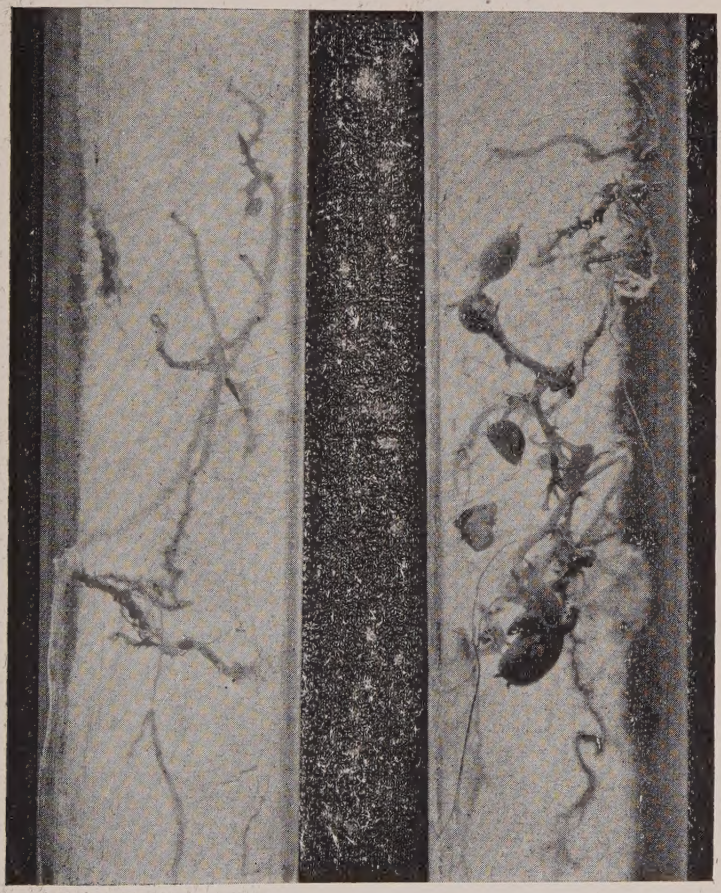


Fig. 1. — Cultures aseptiques de Pomme de terre (var. « Maréchal Franchet d'Esperey ») en solution de Knop glucosée à 5 p. 100 : à gauche, faiblement éclairée ; à droite, fortement éclairées. × 1,5. (Cliché Jeantet.)

(3 *bis*) D'après une évaluation de J. Laurent (1904), le liquide imbibant un sol crayeux fumé est isotonique d'une solution de glucose à 1,13 p. 100 ($\Delta = 0°,141$). Or, comme on le verra ci-après (§ 12), la tubérisation aseptique de la Pomme de terre se produit régulièrement dans les solutions qui atteignent une concentration moléculaire de même ordre (solution de Knop glucosée à 0,8 p. 100 ou glycérinée à 0,408 p. 100, $\Delta = 0°,147$).

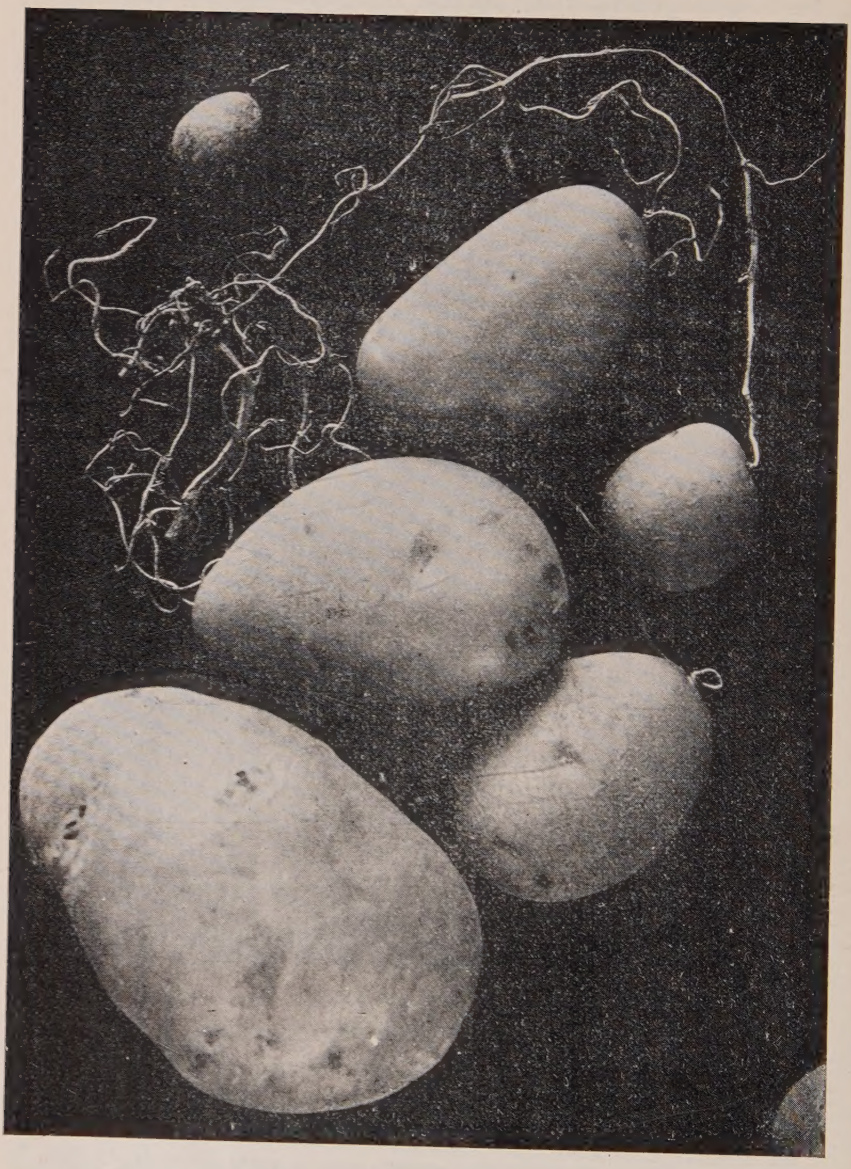


Fig. 2. — Récolte produite par un tubercule aseptique semblable à ceux de la figure 1, transplanté dans les terrains à mycorhizes du Pic du Midi. Grandeur naturelle. (Cliché Jeantet.)

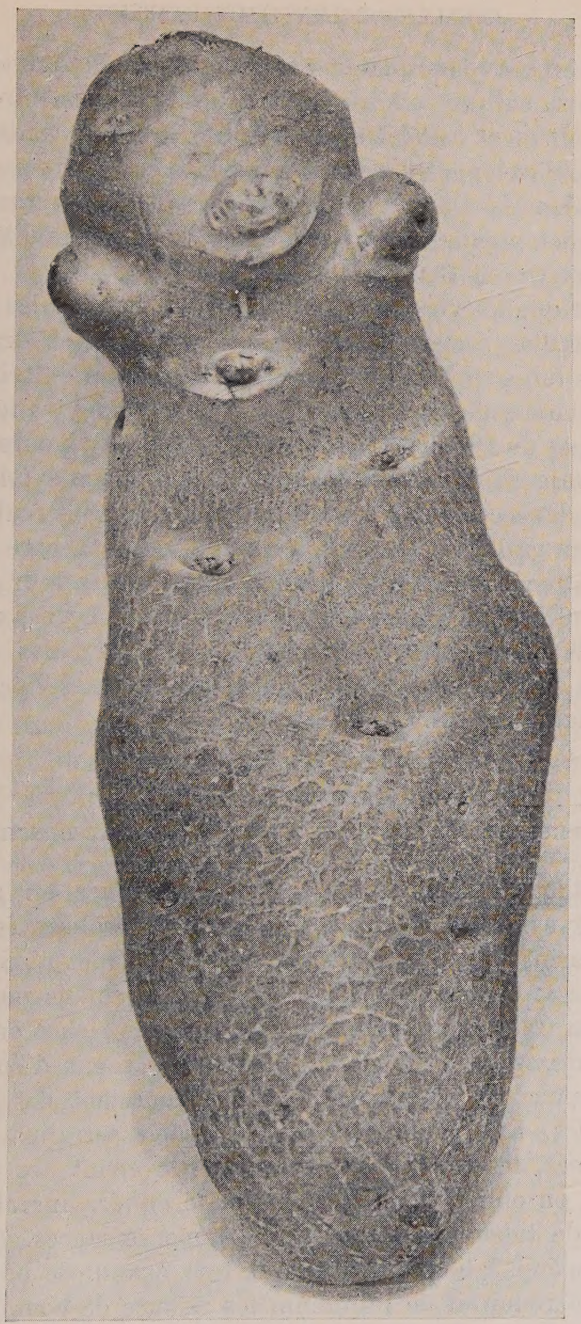


Fig. 3. — Une pomme de terre de la récolte produite par un des tuberculès « secondaires » de la figure 2, transplanté en champ. Grandeur naturelle. (Cliché Jeantet.)

entourée. Il est remarquable, en effet, que la Pomme de terre, bien que sa culture soit très répandue, ne se rencontre qu'exceptionnellement à l'état spontané. Or, dans les cas très rares où elle se développe et se multiplie par tubercules sans aucune intervention de l'homme, on retrouve dans ses racines les mêmes champignons de mycorhizes que chez ses ancêtres sauvages (Magrou et Bouget, 1938).

Du fait que les virus ne se transmettent pas par les graines, les tubercules provenant de semis aseptiques et développés dans des tubes, à l'abri de toute contamination extérieure, en sont rigoureusement exempts. Transportés dans les terrains à mycorhizes du Pic du Midi, ils se développent vigoureusement et sont largement envahis par les champignons symbiotiques (pl. I) ; dans ces conditions, chacun de ces tubercules, gros comme un grain de blé environ, produit, en l'absence de toute fumure, une belle récolte de tubercules de grosseur normale (fig 2), utilisables comme semences (Magrou, Legroux et Bouget, 1939). Transplantés en champ, ces tubercules « secondaires » produisent en abondance des Pommes de terre de grande taille (fig. 3).

Applications a l'agriculture ; prophylaxie des maladies de dégénérescence.

6. **Méthode symbiotique.** — Pour appliquer en grand la méthode symbiotique, il suffirait de généraliser les essais actuellement en cours au Pic du Midi et dans les régions environnantes : explorer méthodiquement les régions incultes du territoire français, y rechercher les stations riches en plantes à mycorhizes, faire dans ces stations des semis d'épreuve et retenir pour la culture celles qui donneraient des résultats favorables. En plantant dans les mêmes terrains, toujours non fumés, les tubercules primaires provenant des semis de graines, on obtiendrait, *dès la seconde année*, une abondante récolte de tubercules utilisables comme semences. En ayant soin d'opérer à bonne distance de tout champ de pommes de terre, on réduirait au minimum les risques de contamination et les semences produites auraient toutes chances d'être saines (La méthode de sélection sur plants provenant de tubercules,

actuellement en usage pour la production de semences saines, exige *cinq ans* et n'offre pas de garantie absolue, en raison de l'existence d'infections inapparentes.)

Pour généraliser la méthode symbiotique, l'idéal serait évidemment de cultiver les champignons des mycorhizes, de manière à pouvoir les répandre dans les champs de pommes de terre. Par malheur, le problème est d'une extrême difficulté, et jusqu'à ces derniers temps, les champignons des mycorhizes à arbuscules et à vésicules avaient résisté à tous les essais de culture. Ce n'est que récemment que l'on a pu obtenir des débuts de développements *in vitro* de certains d'entre eux (4), de celui de la Pomme de terre en particulier (J. Magrou et M^me^ M. Magrou, 1940). Nos tentatives en vue de résoudre ce problème sont rapportées dans un autre mémoire (Magrou, 1940). Nous nous bornerons, dans la deuxième partie de ce travail, à exposer nos expériences sur la tubérisation de la Pomme de terre en milieu aseptique.

7. **Méthodes asymbiotique et symbiotique combinées.** — L'emploi des semis aseptiques de graines en solutions glucosées permet d'éliminer à coup sûr les rares chances de contamination accidentelle que la méthode précédente pourrait laisser subsister. Pour obtenir des tubercules rigoureusement exempts de virus, il suffirait, lors de la transplantation dans les terrains à mycorhizes des tubercules aseptiques obtenus en tubes, de protéger les cultures contre les pucerons transmetteurs de virus au moyen de grillages métalliques ou de tentes de mousseline telles qu'on en emploie dans les exploitations agricoles des Etats-Unis. D'autre part, la technique des semis en tubes donne le moyen de produire, à peu de frais et dans un espace restreint, des centaines de milliers de plantes aseptiques sur lesquelles il est possible d'exécuter des expériences variées.

8. **Importance économique du problème.** — Du fait des maladies de dégénérescence, la récolte de Pommes de terre,

(4) Jones, 1924 ; Magrou, 1935, 1937, 1939 $_2$; Burgeff, 1938 ; Butler, 1939 ; Lihnell, 1939.

qui devrait être, en France pour 1.400.000 hectares de cultures, de 220 à 280 millions de quintaux, se trouve réduite à 150 millions de quintaux environ. Sur les 25 millions de quintaux de semences qu'exigent les plantations françaises, 1.300.000 quintaux seulement, soit à peine 1/20, sont des tubercules sélectionnés, issus de plants exempts de dégénérescence ; ces semences saines provenaient, avant la guerre, soit des syndicats de sélection français (214.000 quintaux), soit d'achats à l'étranger, principalement en Allemagne, en Hollande, en Esthonie [1.084.000 quintaux] (5). Il va sans dire que cette situation, déjà fort alarmante, se trouve considérablement aggravée du fait des événements récents. Elle laisse entrevoir, à plus ou moins longue échéance, la disparition de la plante qui représente la garantie la plus sûre contre les famines.

Si les méthodes que nous proposons, et qui ont déjà reçu un commencement d'application, pouvaient être généralisées à l'ensemble des régions favorables du territoire français, la situation se renverserait en quelques années, et la France arriverait à produire plus de semences saines qu'il ne lui en faut pour ses propres plantations. Alors se réaliserait la vision d'avenir de Noël Bernard qui, le 23 mai 1909, jour où il découvrait les mycorhizes de la Douce-amère, inscrivait ce qui suit dans son cahier d'expériences :

« Voilà donc enfin le champignon capable d'infester les Pommes de terre ! J'ai eu en le trouvant une vive émotion. On va enfin pouvoir rendre aux Pommes de terre leurs conditions de vie normale, avoir la clef des dégénérescences vues par de l'Escluse et Parmentier, et sans doute des mutations expérimentales et tout un avenir nouveau pour l'agriculture ! »

II. — TUBÉRISATION DE LA POMME DE TERRE EN MILIEU ASEPTIQUE

9. **Travaux antérieurs.** — Diverses expériences, dont les plus anciennes remontent à un demi-siècle environ, ont établi que, chez les plantes aptes à tubériser, la formation des tuber-

(5) Chiffres empruntés à MM. Ch. Crépin, Bustarret et Chevalier, 1938.

cules peut dépendre de la concentration des substances dissoutes dans le suc cellulaire. E. Laurent (1888) a montré qu'il est possible d'obtenir des tubercules sur des tiges aériennes de Pomme de terre coupées et plongées dans une solution de saccharose suffisamment concentrée. Noël Bernard (1902) a repris l'expérience de Laurent et en a précisé l'interprétation : des tiges de Pomme de terre coupées sont plongées dans des solutions de glucose, de saccharose, de glycérine ou de chlorure de potassium diversement concentrées. Les bourgeons axillaires de ces boutures se développent soit en tubercules, soit en rameaux feuillés, suivant la concentration de la solution. Au-dessus d'une concentration moléculaire ou, plus exactement, d'une pression osmotique critique, toujours la même, quelle que soit la substance dissoute, il se forme des tubercules, tandis que, pour les concentrations plus faibles, il se développe régulièrement des rameaux. Des solutions très différentes du point de vue chimique donnent donc des résultats comparables, pourvu qu'elles soient isotoniques. Cette expérience montre que la tubérisation dépend moins de la nature chimique des substances dissoutes et de leur valeur nutritive que des propriétés physiques que les solutions tiennent de leur concentration moléculaire.

M. Molliard (1907) a réalisé des expériences de même type, en partant non plus de boutures, mais de plants de semis. Des graines de Radis, semées aseptiquement sur des solutions salines non sucrées, développent des racines grêles. Semées sur les mêmes solutions additionnées d'une certaine proportion de glucose ou de saccharose, elles donnent des plantules à racine principale tubérisée. Par contre, la Pomme de terre, cultivée dans les mêmes conditions, s'est montrée incapable d'absorber, en quantité suffisante, les sucres de la solution nutritive ; que le milieu minéral fût ou non additionné de 5 à 10 p. 100 de glucose, les plantules aseptiques provenant des semis développaient une tige feuillée normale, mais dont les rameaux secondaires ne produisaient pas de tubercules. Pour augmenter l'absorption du glucose par les racines, M. Molliard eut alors recours à un artifice ; il supprima les échanges gazeux des récipients de culture avec l'air extérieur, de manière à ralentir la fonction chlorophyllienne. Dans les

tubes où, à cet effet, le bouchon d'ouate avait été remplacé par un bouchon de caoutchouc, les graines donnèrent des plantules formées d'une tige épaisse et courte, à entre-nœuds raccourcis, à feuilles réduites à des écailles atrophiées, présentant, en un mot, les traits essentiels de la tubérisation ; les cellules parenchymateuses de ces plantules anormales renfermaient d'ailleurs de nombreux grains d'amidon, qui font défaut dans les tiges ordinaires de Pomme de terre (6).

L'accroissement de la concentration des solutions dans lesquelles se développent les plantes n'est pas le seul moyen qui permette d'élever la teneur de la sève en substances dissoutes. On a vu dans ce qui précède que les champignons symbiotiques, en attaquant l'amidon des racines et en le transformant en composés solubles, produisent le même résultat. Les expériences de Noël Bernard sur les Orchidées (1909) montrent que l'action du parasite et celle de la concentration sont rigoureusement parallèles, en d'autres termes, que l'infestation équivaut à l'injection, dans le corps de la plante, d'une solution concentrée.

Ces expériences ont porté, notamment, sur le *Bletilla hyacinthina*, dont les graines, contrairement à celles des autres Orchidées, peuvent germer avec ou sans le concours des champignons symbiotiques. Semées sans champignons sur des milieux nutritifs dilués, où l'abaissement du point de congélation Δ est de 0°,01, elles se développent lentement en plantules grêles, à entre-nœuds allongés. Associées, sur les mêmes milieux, à des champignons d'activité croissante, elles ont un développement plus rapide et produisent un tubercule embryonnaire d'autant plus précoce et d'autant plus volumineux que le mycélium employé est plus actif (7).

Si, d'autre part, on augmente la concentration, sans faire intervenir les champignons, on constate que, pour des concentrations encore relativement faibles (Δ = 0°,02), la croissance devient plus rapide, mais se fait encore par élongation, tandis

(6) Molliard, 1915.

(7) On sait que l'activité des champignons symbiotiques des Orchidées, autrement dit leur aptitude à faire germer les graines, est soumise à des variations comparables aux variations de virulence des bactéries pathogènes (Noël Bernard, 1909 ; J. et M. Magrou, 1933).

que, pour des concentrations fortes ($\Delta = 0°,04$ et mieux encore $= 0°,06$), le mode de croissance change ; la plupart des plantules présentent un tubercule embryonnaire et des entre-nœuds courts. Si l'on compare les plantules obtenues sans champignons à des concentrations de plus en plus élevées, à celles qui se sont développées à une même concentration avec des champignons de plus en plus actifs, on constate un parallélisme étroit entre les deux séries de cultures.

Les expériences sur les Cattleyées ont donné des résultats de même ordre. Semées sans champignons sur des milieux dilués, les graines de Cattleyées ne germent pas. Sur des milieux plus concentrés, elles sont au contraire capables de germination autonome et se développent en donnant des plantules tubérisées conformes au type habituel. Adaptées enfin à vivre sans champignons sur des milieux très fortement concentrés, elles développent des tubercules embryonnaires volumineux et présentant des anomalies morphologiques.

On peut encore accroître la concentration des sucs de la plante en augmentant l'intensité de l'assimilation chlorophyllienne. Des graines d'Oignon, semées aseptiquement sur des solutions sucrées, donnent des plantules dont les racines absorbent le sucre et qui tubérisent (Molliard, 1907). Pourtant, chez cette plante, M. Molliard a pu obtenir la tubérisation aseptique même sur des milieux très dilués (eau de source stérilisée), à condition d'assurer aux cultures un éclairement suffisant. Les substances dissoutes, nécessaires à la tubérisation, sont en ce cas fournies par la photosynthèse. La Carotte et le Dahlia, à la différence du Radis et de l'Oignon, sont incapables d'utiliser les sucres de la solution nutritive. C'est en faisant circuler dans les tubes de culture de l'air chargé de gaz carbonique, de manière à assurer une assimilation chlorophyllienne intense, que M. Molliard (1920) a pu provoquer la tubérisation aseptique de ces deux espèces. Par le même procédé, il a obtenu, avec M. A. Crépin (1934), des tubercules chez des Radis cultivés en solutions minérales peu concentrées (liquide de Knop dilué deux fois), et non sucrées.

Quel que soit le facteur mis en œuvre pour provoquer la formation des tubercules (lumière, culture en solutions concentrées, en atmosphère riche en gaz carbonique ou en

air confiné, symbiose avec des champignons endophytes), le résultat est toujours un accroissement de la teneur du suc de la plante en substances solubles. C'est, en définitive, de cette modification du milieu intérieur de l'organisme que paraît dépendre le changement du mode de croissance qui aboutit à la tubérisation.

10. **Tubérisation aseptique de la Pomme de terre.** — Nous nous sommes proposé d'étudier l'influence de la concentration du milieu de culture sur des plantules provenant de semis aseptiques de graines de Pomme de terre. Ces graines, appartenant aux variétés « Maréchal Franchet d'Esperey » et « Triumph », ont été stérilisées par immersion dans l'eau oxygénée pendant six heures au moins, suivant la technique que nous avons indiquée jadis avec M. Pinoy (1912). Elles ont été ensuite semées, sans lavage à l'eau, en tubes stériles, sur des plaques de coton imbibées de solution de Knop renfermant du glucose à des concentrations variées (8). Les graines ont germé régulièrement mais, au cours d'un premier essai, n'ont donné, dans les tubes laissés, l'été, dans notre laboratoire à l'Institut Pasteur, que des plantules grêles, portant des feuilles réduites à l'état d'écailles minuscules. Pourtant, l'une de ces plantes misérables, développée dans une solution de glucose à 5 p. 100 (concentration initiale), a produit, près d'un an après le semis, un petit tubercule, à l'extrémité d'un rameau latéral de la tige principale. Pensant que, dans cet essai, le mauvais état de la végétation tenait à l'insuffisance de l'éclairement, nous avons, l'année suivante, procédé à une

(8) Il existe plusieurs variantes de la formule de la solution nutritive minérale de Knop ; nous avons adopté la formule suivante, citée par MM. Dop et Gautié (1928) :

Eau	1.000 grammes.
Sulfate de magnésium	0 gr. 25
Nitrate de calcium	1 gramme.
Phosphate acide de potassium	0 gr. 25
Chlorure de calcium	0 gr. 12
Chlorure ferrique	Traces.

Dans nos essais, nous avons le plus souvent remplacé les traces de chlorure ferrique par 0 gr. 04 par litre de sulfate ferrique. Les solutions ont toujours été faites en eau bidistillée.

FIG. 4. — Tubercule aseptique provenant du semis d'une graine (var. « Maréchal Franchet d'Esperey ») sur solution de Knop glucosée à 5 p. 100. × 7. Le grossissement permet de distinguer, à la surface du tubercule, les yeux et les lenticelles. (Cliché Jeantet.)

nouvelle expérience, mais, cette fois, les cultures ont séjourné pendant les mois d'été à la montagne (en juillet dans les Vosges, à 340 mètres d'altitude, en août dans les Alpes, à 1.700 mètres, au laboratoire de la *Linnæa* (9). Dans cette station, les tubes, inclinés à 18° environ, sont restés à demeure dans une pièce vivement éclairée, tout contre un grand vitrage exposé au nord ; ils recevaient donc pendant toute la durée du jour une lumière diffuse intense. Toutes les graines semées appartenaient à la variété « Maréchal Franchet d'Esperey ».

Les semis avaient été faits le 10 mars 1937, en tubes de verre « pyrex », à raison de 6 graines par tubes, sur plaques de coton imbibées de solution de Knop, pure ou renfermant du glucose aux concentrations de 1, de 5 et de 10 p. 100 (10). Dans ces conditions (sauf dans la solution à 10 p. 100, où ne s'étaient produites que de très rares germinations bientôt arrêtées), les plantules, dès leur exposition à la lumière intense, se sont développées vigoureusement, différenciant en grand nombre de larges feuilles colorées en vert foncé. L'apparition de tubercules, formés en arrière du sommet végétatif de la tige principale ou de ses rameaux latéraux, a été notée le 15 décembre suivant, dans les tubes renfermant du glucose à 5 p. 100. Un mois après, des tubercules apparurent dans la solution à 1 p. 100, mais en nombre moindre (4 tubercules en moyenne par tube dans la solution à 5 p. 100, 2 tubercules par tube dans la solution à 1 p. 100). Les tubercules obtenus, colorés en vert, en jaune ou en violet, sont de forme et de structure normale (fig. 1, § 5 ; fig. 4) et renferment de l'amidon en abondance (pl. II). Sur la solution de Knop sans glucose, aucun tubercule ne s'est formé, non plus que dans les tubes laissés à titre de témoins à l'Institut Pasteur, quelle que fût d'ailleurs leur concentration en glucose.

L'expérience montre donc qu'il est possible, en combinant l'action de la lumière à celle de la concentration en glucose,

(9) Ce laboratoire, situé à Bourg-Saint-Pierre, dans le Valais, est dirigé par M. le professeur Fernand Chodat, de l'Université de Genève, que nous remercions bien vivement de son accueil amical.

(10) Pour éviter une évaporation trop rapide, les tubes étaient coiffés d'un capuchon de verre dont le fond était garni d'une rondelle de coton cardé.

d'obtenir une tubérisation normale chez des plantules de Pomme de terre cultivées aseptiquement.

11. **Influence de la concentration en sels.** — Parallèlement

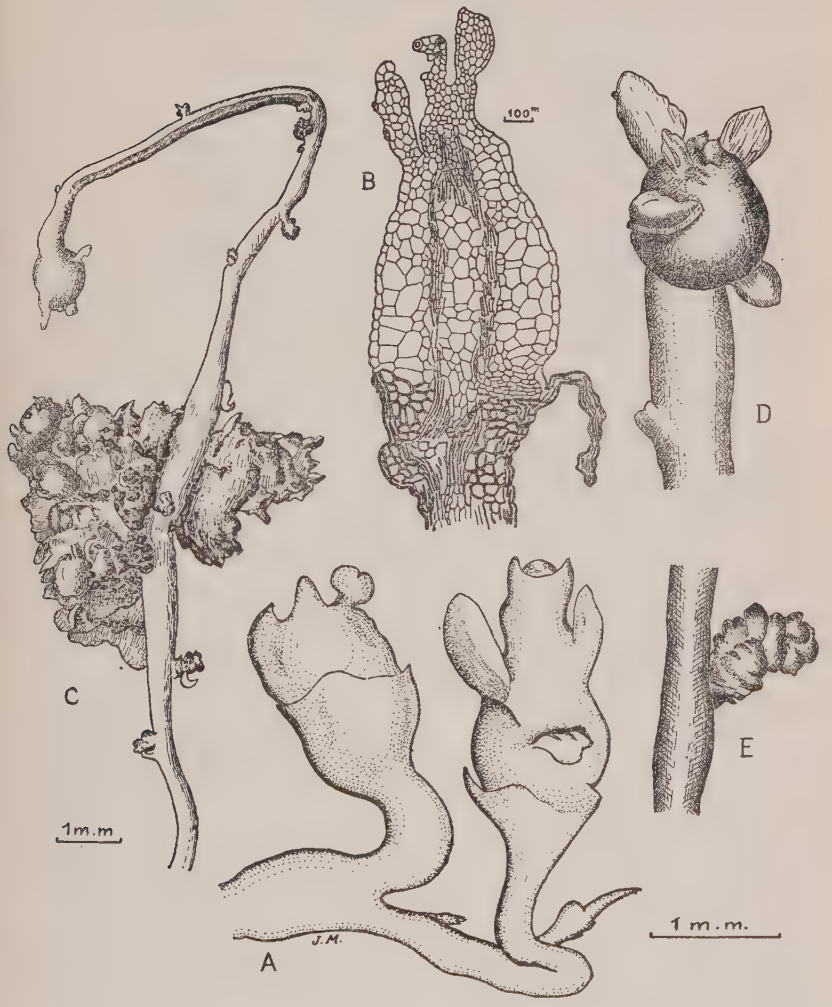


Fig. 5. — A, courts rameaux renflés obtenus sur solution de Knop concentrée cinq fois (var. « Triumph »); B, coupe longitudinale de l'un des rameaux renflés figurés en A, montrant la forme isodiamétrique des cellules corticales et médullaires; C, formation tubériforme fasciée obtenue sur solution de Knop concentrée cinq fois et glucosée à 1 p. 100 (var. « Triumph »): D et E, détails de la figure C : D, renflement terminal de la tige principale; E, rameau latéral à entre-nœuds courts et à feuilles charnues.

L'échelle de 1 millimètre, en bas et à droite, se rapporte aux figures A, D et E.

à ces essais, nous avons fait varier la teneur en sels du milieu de culture, en employant les produits qui entrent dans la solution de Knop, dans les mêmes proportions, mais à des concentrations plus fortes. Dans la solution de Knop concentrée cinq fois, de petits renflements, à cellules corticales et médullaires isodiamétriques, se sont produits, chez certaines plantules, en arrière des bourgeons terminaux (fig. 5, A, B). Dans la solution de Knop concentrée cinq fois et renfermant 1 à 5 p. 100 de glucose, on voit souvent se développer, en plus de ces renflements subterminaux (fig. 5, D), de courts rameaux renflés, à nœuds très rapprochés, à feuilles réduites et charnues (fig. 5, E) ; parfois ces rameaux deviennent coalescents et constituent des sortes de tubercules fasciés, pauvres en amidon, situés à l'extrémité ou sur le côté de la tige principale [fig. 5, C] (11). Ces formations diffèrent des tubercules normaux de la Pomme de terre par leur forme et aussi par leur structure, puisqu'elles n'accumulent pas dans leurs tissus de réserves à l'état figuré. Toutefois, avec leurs feuilles réduites et la forme isodiamétrique de leurs cellules, qui entraîne le raccourcissement et l'épaississement des entre-nœuds, elles présentent les caractères essentiels de la tubérisation.

Enfin, dans la solution de Knop concentrée dix fois, il s'est produit, dès la germination, un renflement fusiforme de l'axe hypocotylé, mais les plantules n'ont pas tardé à périr.

Que l'élévation de la concentration soit réalisée au moyen de glucose ou au moyen de sels, elle agit donc dans le même sens, mais avec des variantes qui dépendent de la nature chimique des substances dissoutes.

12. **Concentration moléculaire et tubérisation.** — Après cette première expérience, nous avons tenté de préciser les concentrations limites en glucose compatibles avec la tubérisation ; nous avons cherché d'autre part si l'on peut obtenir des tubercules en substituant, toutes choses égales d'ailleurs, la glycérine au glucose.

Les graines, stérilisées, comme précédemment, par l'eau

(11) L'abaissement du point de congélation Δ est égal à 0°170 pour la solution de Knop concentrée cinq fois et respectivement à 0°295 et 0°795 pour la même solution renfermant 1 et 5 p. 100 de glucose.

oxygénée, ont été semées le 21 mars 1938 en tubes de verre « Pyrex » sur des plaques de coton imbibées de solution de Knop pure ou renfermant, soit du glucose aux concentrations de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 2, 5, 6, 7 et 8 p. 100, soit de la glycérine aux concentrations, respectivement équimoléculaires aux précédentes, de 0,102, 0,204, 0,306, 0,408, 0,510, 1,02, 2,55, 3,06, 3,57 et 4,08 p. 100. L'expérience a porté sur les variétés « Maréchal Franchet d'Esperey » et « Imperator ». Il a été fait aussi quelques semis des variétés « Violette du Peyras » (12), « Président » et « Cellini », mais seulement en solution de Knop glucosée à 5 p. 100.

Les cultures ont séjourné en juillet dans les Vosges, à 340 mètres d'altitude, en août à la station biologique de Besse (13), en Auvergne (1.000 mètres), en septembre, dans la vallée de l'Ourcq, sur une terrasse exposée au nord. A Besse, la disposition adoptée était la même qu'à la *Linnæa*, dans l'expérience précédente : tubes inclinés, laissés à demeure dans le laboratoire, tout contre un grand vitrage exposé au nord et éclairé tout le jour par une lumière diffuse intense. Quelques jours après leur transport en Auvergne, les plantules cultivées en solution de Knop pure ou renfermant 0,2 à 2 p. 100 de glucose ou 0,102 à 1,02 de glycérine se sont développées de façon exubérante, donnant des feuilles larges de 5 millimètres ou plus. Aux concentrations égales ou supérieures à 5 p. 100 en glucose et à 2,55 p. 100 en glycérine, les feuilles, d'un vert très foncé ou parfois (dans les variétés « Imperator » et « Violette du Peyras »), colorées en violet, sont restées de taille réduite.

Le tableau ci-après indique, pour chaque concentration du liquide de Knop en glucose ou en glycérine, l'abaissement Δ du point de congélation, le nombre de plantules en expérience, la date d'apparition du premier tubercule et le nombre total de tubercules (en valeur absolue et rapporté à 100 plantules).

On voit, d'après ce tableau, que les premiers tubercules sont

(12) La variété « Violette du Peyras » est une variété nouvelle obtenue dans les Pyrénées par M. J. Bouget, à partir de la variété « Violette » (Costantin, 1933).

(13) Dirigée par M. le professeur Chaze, de l'Université de Clermont, à qui nous sommes vivement reconnaissant de son accueil.

CONCENTRATION p. 100	Δ (en degrés centigrades)	NOMBRE de plantules	DATE d'apparition du premier tubercule	NOMBRE total de tubercules	NOMBRE de tubercules pour 100 plantules
			1° *Glucose* :		
0	0,05	11		0	0
0,2	0,074	12		0	0
0,4	0,099	11	22 janv. 1939.	2	18
0,6	0,123	11		0	0
0,8	0,147	12	20 nov. 1938.	3	25
1	0,175	11	28 nov. 1938.	3	27,2
2	0,294	12	1er nov. 1938.	7	58,3
5	0,675	28	31 juillet 1938.	17	60,7
6	0,797	12	20 août 1938.	4	33,3
7	0,919	11		0	0
8	1,041	3		0	0
			2° *Glycérine* :		
0,102	0,074	6		0	0
0,204	0,099	6		0	0
0,306	0,123	6		0	0
0,408	0,147	6	28 nov. 1938.	3	50
0,510	0,175	4	29 janv. 1939.	1	25
1,02	0,294	6	20 nov. 1938.	4	66,6
2,55	0,675	16	3 août 1938.	5	31,2
3,06	0,797	6		0	0
3,57	0,919	4		0	0
4,08	1,041	3	4 sept. 1938.	15	500

apparus, presque en même temps, aux concentrations équimoléculaires de 5 p. 100 en glucose et de 2,55 p. 100 en glycérine. La limite inférieure de concentration pour laquelle des tubercules se sont formés est de 0,4 p. 100 pour le glucose et de 0,408 p. 100 pour la glycérine. Compte tenu de la différence de poids moléculaire entre ces deux composés, elle est donc deux fois plus basse pour le glucose. Mais dans la solution glucosée à 0,4 p. 100, les tubercules, d'ailleurs de petite taille, sont apparus tardivement (22 janvier 1939). D'autre part, la tubérisation fait défaut à la concentration en glucose immédiatement supérieure (0,6 p. 100) pour reparaître dans la solution glucosée à 0,8 p. 100. Aux concentrations de 7 et 8 p. 100 en glucose, de 3,06 et de 3,57 en glycérine, aucun tubercule proprement dit ne s'est formé, mais les plantules avaient des tiges épaissies, à entre-nœuds courts, à feuilles réduites, à cellules parenchymateuses gorgées de grains d'amidon ;

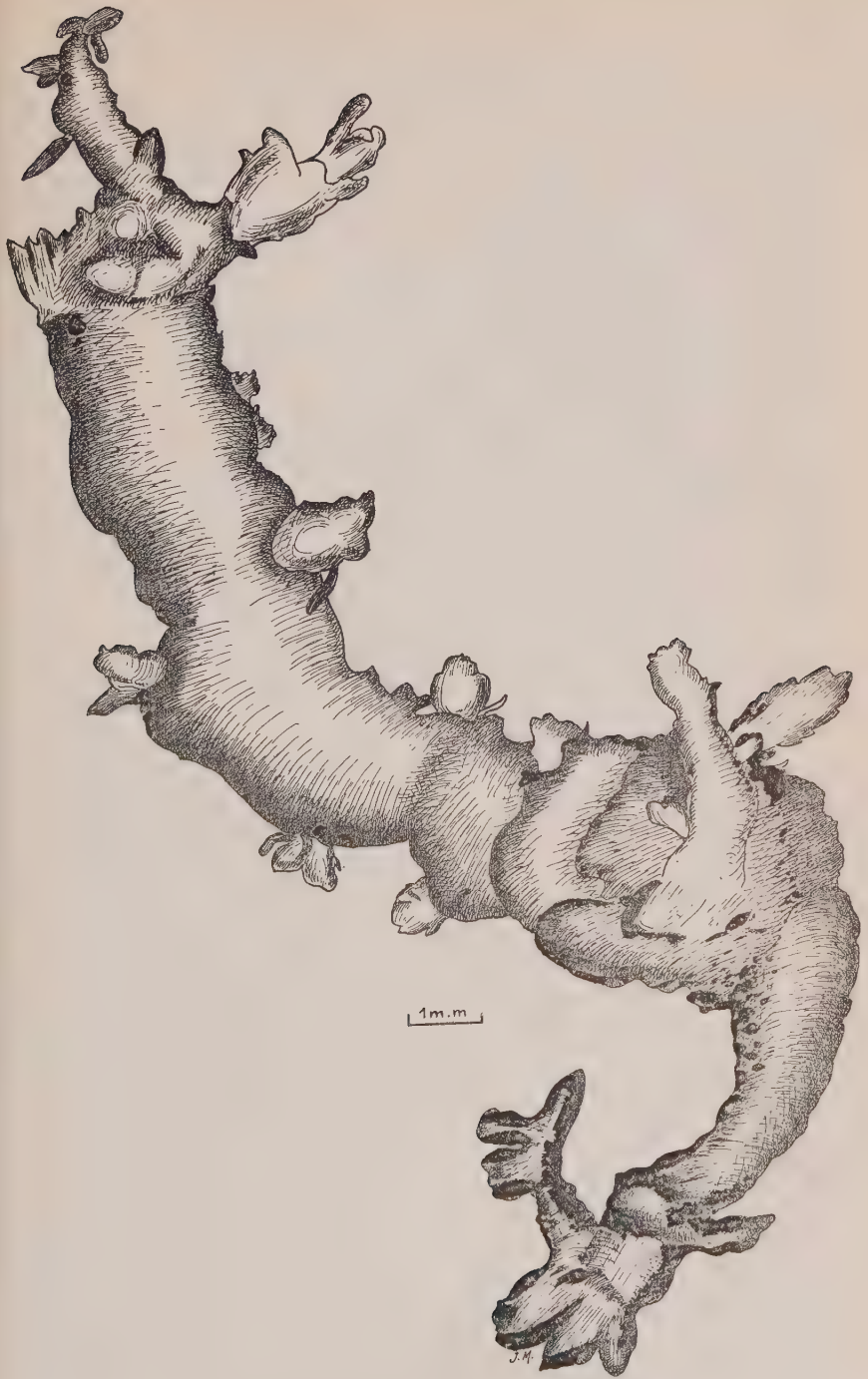


Fig. 6. — Plante aseptique (var. « Maréchal Franchet d'Esperey »), tubérisée en totalité, sur solution de Knop renfermant 3,57 p. 100 de glycérine.

elles étaient, en quelque sorte, tubérisées sur toute leur longueur (fig. 6). Ce type particulier de tubérisation (fréquent aussi aux concentrations de 5 et 6 p. 100 en glucose et de 2,55 p. 100 en glycérine), rappelle celui que M. Molliard (1915) a obtenu sur milieu glucosé en atmosphère confinée. Dans la glycérine à 4,08 p. 100, deux plantules rabougries et d'aspect misérable ont produit de nombreux tubercules à l'extrémité de rameaux secondaires développés au voisinage du sommet végétatif de la tige principale (fig. 7).

L'inspection de la sixième colonne du tableau montre qu'il existe un optimum de rendement en tubercules proprement dits aux concentrations de 2 et de 5 p. 100 en glucose, de 1,02 p. 100 en glycérine. Un deuxième optimum, beaucoup plus marqué, se manifeste dans la solution glycérinée à 4,08 p. 100.

Le rendement en tubercules change avec les variétés. Aux concentrations de 2 et de 5 p. 100 en glucose, de 1,02 et 2,55 en glycérine, les variétés se classent comme il suit, par ordre de productivité décroissante : « Violette du Peyras », « Maréchal Franchet d Esperey », « Imperator », « Président », et enfin « Cellini », qui n'a produit aucun tubercule (il est vrai que trois plantules seulement de cette variété ont survécu un temps suffisant).

Des plantules témoins, appartenant aux mêmes variétés, élevées dans les mêmes conditions, et en même nombre que les précédentes, sont restées à l'Institut Pasteur, dans notre laboratoire, pendant toute la durée de l'expérience. Elles se sont développées de façon beaucoup moins vigoureuse, donnant de longues tiges grêles à feuilles très réduites. Des tubercules se sont formés aux concentrations de 2 et de 5 p. 100 en glucose. Aucun tubercule ne s'est développé dans les solutions glycérinées.

En résumé, chez des plantules aseptiques de Pomme de terre transportées en montagne et vivement éclairées pendant une partie de l'été, le glucose et la glycérine se montrent également aptes à provoquer la tubérisation, et les concentrations moléculaires actives sont les mêmes pour ces deux composés, à trois exceptions près : le glucose à 0,4 et à 6 p. 100, qui a donné des tubercules alors qu'il ne s'en est pas produit dans

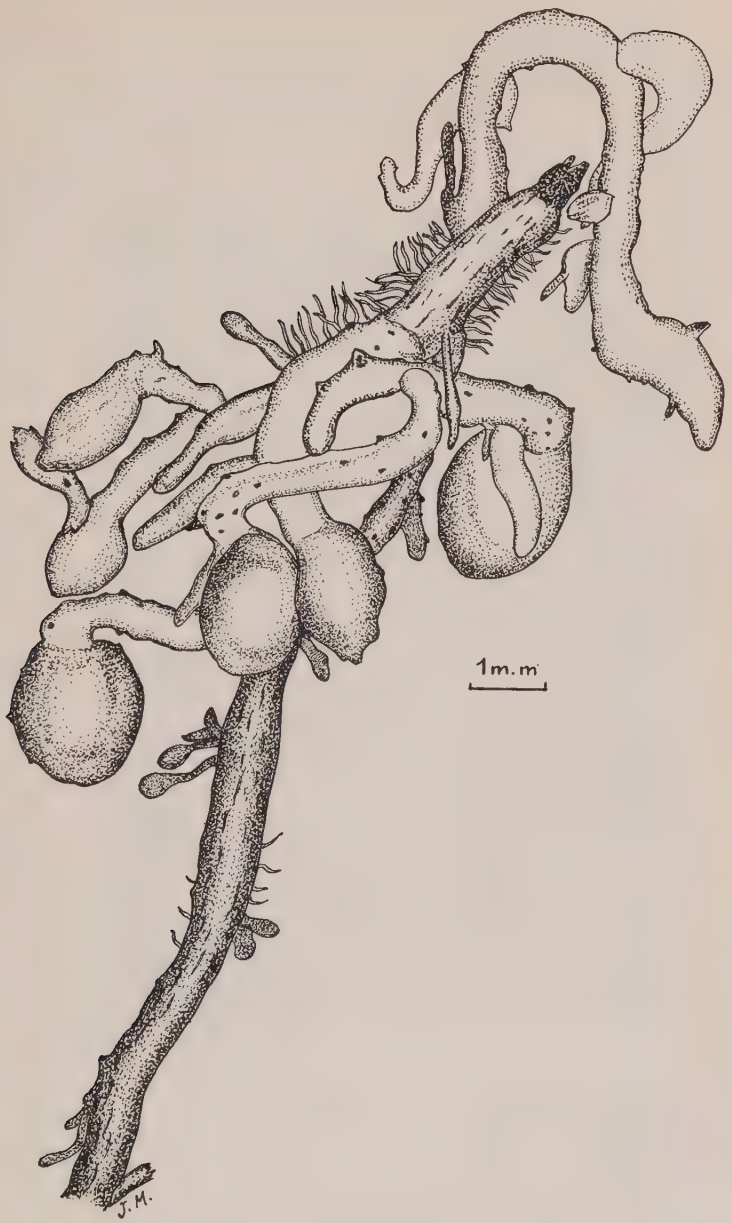


FIG. 7. — Plante aseptique (var. « Maréchal Franchet d'Esperey »), obtenue sur solution de Knop renfermant 4,08 p. 100 de glycérine. Nombreux tubercules développés aux dépens de rameaux secondaires, nés au voisinage du sommet végétatif de la tige principale.

les solutions isotoniques de glycérine (0,204 et 3,06 p. 100) ; la glycérine à 4,08 p. 100, où des tubercules proprement dits se sont formés, alors que dans la concentration correspondante en glucose (8 p. 100), il s'est produit seulement une tubérisation massive des plantules. Chez les plantules laissées à Paris pendant tout le cours de leur développement et soumises à un éclairement beaucoup moins intense, le glucose peut encore provoquer la tubérisation, mais seulement à partir d'une concentration minima plus élevée.

Dans une nouvelle série d'expériences, M. Molliard (1939) a obtenu des résultats de même ordre en utilisant comme milieu de culture une solution saline gélosée renfermant 5 p. 100 ou 7,5 p. 100 de saccharose. Les graines semées sur ce milieu ont donné des plantes dont le développement s'est poursuivi du 1er avril au 15 septembre 1938 ; un grand nombre d'entre elles ont produit, aux dépens de leurs rameaux secondaires, des tubercules verts ou violets, à parenchyme très riche en amidon et tout à fait identiques aux tubercules normaux. Les solutions de saccharose à 5 et à 7,5 p. 100, isotoniques respectivement aux solutions de glucose à 2,6 et à 3,9 p. 100, rentrent dans les limites des concentrations moléculaires qui, dans nos expériences, se sont montrées actives ; les résultats de M. Molliard concordent donc avec les nôtres.

13. **Cultures à l'obscurité.** — Quelques cultures de l'expérience précédente, en solutions fortement concentrées (6, 7 et 8 p. 100 de glucose ; 3,57 et 4,08 p. 100 de glycérine), ont été placées, dès le 8 avril 1938, à l'obscurité complète. Dans ces conditions, les cultures en glycérine se sont mal développées. Les cultures en glucose ont donné des plantules décolorées, à très longues tiges grêles portant des feuilles réduites à des écailles minuscules. Des tubercules tout à fait typiques se sont formés aux concentrations de 7 et de 8 p. 100 en glucose (fig. 8).

Ces faits paraissent contradictoires avec les précédents, qui montraient une tubérisation d'autant plus active que l'éclairement était plus intense. Mais la contradiction n'est qu'apparente, et, dans les deux expériences, la tubérisation est sous

la dépendance d'un seul et même facteur : l'accroissement de la concentration du milieu intérieur de la plante. M. Molliard (1905) a montré, en effet, qu'il existe un antagonisme très accentué entre l'assimilation du carbone de l'air par la fonction chlorophyllienne et l'absorption du sucre par les

Fig. 8. — Tubercule aseptique (var. « Imperator ») obtenu à l'obscurité sur solution de Knop glucosée à 7 p. 100. × 6. (Cliché Jeantet.)

racines ; on peut donc, en supprimant cette assimilation, faire pénétrer dans la plante une quantité maxima de sucre. C'est ce qui s'est produit dans nos expériences à l'obscurité, tandis que, dans les expériences à la lumière, la concentration et la photosynthèse ont agi de concert pour augmenter la teneur des

sucs de la plante en substances dissoutes, et par là, pour favoriser la tubérisation.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de M. Molliard qui, comme on l'a vu plus haut (§ 9), provoque la tubérisation de diverses plantes par des moyens en apparence opposés : soit, en milieu non glucosé, en stimulant la fonction chlorophyllienne par culture dans une atmosphère chargée de gaz carbonique, soit, en présence de sucres, en ralentissant cette même fonction par culture en atmosphère confinée.

14. **Mode d'action des solutions concentrées.** — Lorsque le développement d'une Pomme de terre aboutit à la formation de tiges non tubérisées, la croissance se fait par élongation : en arrière du bourgeon terminal, formé de petites cellules, se trouve une région de croissance où les cellules s'allongent sans s'épaissir notablement. Quand un tubercule se forme, les cellules de la région de croissance, au lieu de s'allonger, s'accroissent en restant isodiamétriques ; il en résulte que la tige s'épaissit plus et s'allonge moins.

Nous avons vu que la croissance par épaississement se substitue à la croissance par élongation quand la pression osmotique à l'intérieur des cellules dépasse une certaine limite. Que la croissance se fasse suivant l'un ou l'autre de ces deux modes, elle s'accompagne toujours d'une absorption d'eau. « Qu'il s'agisse de turgescence ou de croissance, écrit Noël Bernard (1904), l'eau pénètre toujours dans la cellule par osmose. S'il s'agit d'un phénomène de turgescence, elle pénètre jusqu'à ce que la pression osmotique, décroissante à mesure que le suc se dilue, soit équilibrée par les forces de tension croissantes des parois élastiques de la cellule ; l'absorption d'eau s'arrête quand cet équilibre est atteint. S'il s'agit au contraire de croissance, l'équilibre ne s'établit pas, la pression osmotique ne décroît pas indéfiniment malgré la pénétration continue de l'eau. » En pareil cas, un mécanisme doit nécessairement intervenir, qui ait pour effet d'augmenter la quantité absolue des substances dissoutes dans le suc cellulaire, de telle sorte que la pression osmotique à l'intérieur des cellules reste constamment supérieure à la pression osmotique du milieu extérieur. C'est à ce prix seulement que l'eau pourra

continuer indéfiniment à pénétrer dans les cellules et que la croissance sera possible.

Cette « réaction osmotique » de la cellule s'explique en partie par la dislocation des parties colloïdales du protoplasma ou par la solubilisation de substances insolubles. C'est le phénomène désigné par Errera sous le nom d'*anatonose*. L'anatonose se réalise de manière évidente quand les racines sont envahies par un champignon symbiotique qui saccharifie l'amidon ; en ce cas, on peut voir les grains d'amidon se solubiliser et disparaître au contact ou au voisinage de l'endophyte (*Cf.* § 5).

Mais quand une cellule est plongée dans un liquide hypertonique, le courant d'eau change de sens ; l'eau sort de la cellule et passe dans le milieu extérieur, le protoplasma se contracte, et ce n'est plus la turgescence, mais son inverse, la plasmolyse, qui se produit. Pourtant, au bout d'un certain temps, on assiste à la régression de la plasmolyse, et la cellule, restée vivante, redevient turgescente. D'autre part, on a vu que les plantes peuvent vivre et croître vigoureusement dans des solutions hypertoniques stérilisées. Il faut donc que, dans ces conditions même, un mécanisme régulateur intervienne, qui maintienne la concentration intracellulaire constamment supérieure à la concentration du milieu ambiant.

Ici encore, l'anatonose peut être invoquée, même en l'absence d'organismes symbiotiques, et Noël Bernard (1909) suppose que l'élévation de la pression osmotique d'un liquide qui baigne des cellules est capable de provoquer la mise en liberté dans le suc cellulaire de substances chimiques jusque-là combinées.

Pour M. L. Lapicque (1925), l'anatonose, dont il admet la réalité, ne suffit pas toutefois à elle seule à rendre compte des faits. Il y a, en outre, « pompage » actif des sels du milieu extérieur. Cette absorption des sels, qui est d'ailleurs sélective, ne se produit pas seulement aux dépens des solutions concentrées ; elle a lieu même quand la pression osmotique extérieure est considérablement plus faible que la pression intérieure. Il s'agit d'une fonction physiologique spéciale, par laquelle la cellule s'assure l'excès de pression osmotique qui lui est nécessaire. A ce mécanisme, qu'il explique par une

hypothèse ingénieuse, M. Lapicque a donné le nom d'*épictèse* (κτῆσις acquisition, ἐπί, en excès).

Il n'est pas douteux que, dans les expériences de culture aseptique que nous venons de décrire, l'épictèse n'intervienne et que les plantes n'absorbent par ce mécanisme les électrolytes de la solution nutritive. Quand cette solution renferme des sucres ou de la glycérine, l'absorption de ces composés organiques concourt, avec celle des sels, à maintenir la pression osmotique interne au niveau requis. De nombreuses expériences, celles, entre autres, de J. Laurent (1904) et celles de M. Molliard citées ci-dessus, ont établi, en effet, que les racines de beaucoup de plantes vertes sont capables d'absorber les sucres ou la glycérine contenus dans les solutions nutritives où elles se développent. L'observation suivante nous en a apporté la confirmation :

L'abaissement Δ du point de congélation du liquide de culture a été mesuré le 2 mars 1939 dans trois tubes où des graines de Pomme de terre avaient été semées aseptiquement le 21 mars 1938. Alors que le Δ initial de la solution (liquide de Knop renfermant 0,4 p. 100 de glucose) était égal à 0°099, il n'atteignait plus, lors de la seconde évaluation, faite près d'un an après le semis, que 0°05, et cela bien que, par suite de l'évaporation, la masse totale du liquide eût été fortement réduite. C'est donc que la majeure partie des substances dissoutes avait disparu de ce liquide ; l'analyse chimique montra d'ailleurs qu'il ne renfermait plus trace de glucose.

15. **Culture des tubercules aseptiques.** — Nous avons signalé plus haut (§ 7) l'intérêt que pourraient présenter, pour la production de plant exempt de virus, les petits tubercules obtenus dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Aussi avons-nous tenté, avec MM. Legroux et Bouget (1939) de réaliser la culture de la Pomme de terre à partir de ces semences.

Plantés en pots dans la terre du jardin de l'Institut Pasteur, les petits tubercules aseptiques n'ont donné que des ébauches insignifiantes de développement. Transportés aseptiquement dans des tubes à essai stérilisés, sur coton imbibé de solution de Knop glucosée à 2 ou à 5 p. 100, certains d'entre eux se sont développés abondamment, mais sans tubériser ; d'autres

ont donné des plantes qui ont produit à leur tour des tubercules plus gros que ceux qui leur avaient donné naissance. (C'est ainsi qu'un tubercule primaire, gros environ comme un grain de blé, a donné un tubercule secondaire atteignant la taille d'un noyau de cerise.)

Ces résultats étaient insuffisants pour permettre d'envisager des applications agricoles. Nous avons alors planté des tubercules primaires, provenant directement des semis aseptiques de graines, dans la terre des hautes prairies pyrénéennes, riche en plantes à mycorhizes, où nous avions fait nos cultures symbiotiques antérieures. Les tubercules ont été plantés en godets, sans aucune fumure, en mai 1939, dans les jardins de l'Institut de Physique du Globe de Bagnères-de-Bigorre (14). Après développement des premières pousses feuillées, un certain nombre de plantes ont été rempotées dans la même terre et conservées à Bagnères, sous cages métalliques grillagées destinées à les protéger contre les pucerons transmetteurs de virus ; d'autres ont été repiquées en pleine terre, dans des champs d'expériences étagés sur les pentes du Pic du Midi, à 1.400 et à 1.700 mètres d'altitude. A l'arrachage, on a constaté la production, à la base de chaque pied, d'environ 5 tubercules de grosseur moyenne, en tout semblables aux tubercules-semences employés en agriculture (fig. 2, § 5). Douze de ces tubercules, plantés en mars 1940 dans un champ du domaine du Luc (Var) ont produit, en juillet de la même année, une récolte totale de 18 kilogrammes de pommes de terre de grande taille (fig. 3, § 5), portant des yeux très nombreux.

Toutes les plantes tubérisées obtenues dans les terrains du Pic du Midi, par plantation de tubercules primaires aseptiques, se sont montrées, sans exception, abondamment pourvues de mycorhizes (pl. I). La Pomme de terre ainsi cultivée a donc retrouvé, après un rajeunissement préalable dû à la reproduction sexuée, les conditions de vie qui étaient celles de ses ancêtres sauvages ; elle s'est réadaptée à la symbiose à laquelle, avant sa domestication, elle était soumise sans doute depuis des millénaires.

(14) Dirigé par M. J. Baillaud, à qui nous adressons nos vifs remerciements.

Nous poursuivons actuellement, avec MM. Legroux et Bouget, des essais d'application en grand de cette nouvelle méthode de culture, qui pourrait fournir un moyen de lutter efficacement contre les maladies de dégénérescence de la Pomme de terre.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1° A l'état sauvage, la Pomme de terre héberge dans ses radicelles des champignons de mycorhizes, qui ont disparu chez la plante cultivée.

2° Des champignons identiques existent chez la Douce-amère, congénère sauvage et vivace de la Pomme de terre. Si l'on sème des graines de Pomme de terre dans un sol où croît la Douce-amère, une partie des pieds obtenus contractent la symbiose avec le champignon de cette plante, tandis que d'autres résistent à l'infection. Or, seules produisent des tubercules les plantes chez lesquelles des mycorhizes se sont formées. Il y a donc, dans les conditions de l'expérience, c'est-à-dire chez les plants de semis et en l'absence de tout engrais, corrélation entre l'adaptation à la symbiose et la tubérisation.

3° Des champignons capables de contracter avec la Pomme de terre une symbiose mycorhizienne existent en abondance dans le sol des hauts pâturages des montagnes, riches en plantes à mycorhizes. Des graines de Pomme de terre, semées sans fumure dans de tels terrains, donnent des plantes dont les racines sont largement envahies par les champignons symbiotiques, et qui produisent d'abondantes récoltes de tubercules.

4° Semées aseptiquement sur des solutions nutritives minérales peu concentrées (liquide de Knop), les graines de Pomme de terre donnent naissance à des plantes qui se développent sans jamais produire de tubercules. Si l'on ajoute à la solution minérale des doses croissantes de glucose ou de glycérine, des tubercules se forment à partir d'une concentration moléculaire limite qui, à quelques fluctuations près, est la même pour l'un et l'autre de ces composés organiques. Ces tubercules, développés en arrière du sommet végétatif des tiges

principales ou secondaires, sont riches en amidon et ont l'aspect et la structure des tubercules normaux.

5° La limite de concentration en glucose à laquelle les tubercules apparaissent est d'autant moins élevée que l'éclairement est plus intense. A l'obscurité complète, on peut obtenir des tubercules normaux dans des solutions fortement concentrées en glucose qui, à la lumière, provoquent une tubérisation massive des tiges, mais non la formation de tubercules proprement dits.

6° Si l'on accroît la concentration en sels minéraux du liquide de Knop, on voit apparaître des renflements subterminaux des tiges et des productions tubériformes fasciées, constituées par de courts rameaux coalescents, renflés, à entre-nœuds courts, à feuilles réduites, pauvres en amidon.

7° Dans les racines qu'ils envahissent, les champignons symbiotiques saccharifient l'amidon. Leur présence équivaut donc à une injection de sucre dans les racines, et leur action est identique à celle des solutions sucrées. Dans les champs cultivés, où les mycorhizes ont disparu, la fumure du sol supplée à leur absence en élevant la concentration des liquides où baignent les racines. Quand, par exception, la Pomme de terre fait retour à l'état sauvage, les champignons symbiotiques reparaissent dans ses racines.

8° Plantés dans les terrains à mycorhizes des hautes altitudes, les tubercules provenant des semis aseptiques de graines donnent des plantes dont les racines sont largement envahies par des champignons symbiotiques et qui produisent des tubercules en abondance. Ces tubercules sont à coup sûr exempts de virus, si l'on a soin de faire la culture à l'abri des causes de contamination.

9° Des méthodes nouvelles de production de plant sain, fondées sur les données qui précèdent, sont proposées. L'essai qui en a été fait sur une échelle restreinte laisse entrevoir que leur emploi généralisé pourrait à brève échéance enrayer la dégénérescence de la Pomme de terre, qui compromet gravement l'avenir même de l'espèce.

BIBLIOGRAPHIE

Bernard (Noël). *Rev. gén. Bot.*, **14**, 1902.
Bernard (Noël). *C. R. Acad. Sciences*, **135**, 1902, p. 706.
Bernard (Noël). *Rev. gén. Bot.*, **16**, 1904. p. 405.
Bernard (Noël). *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 9e série, **9**, 1909, p. 1.
Bernard (Noël). *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 9e série, **14**, 1911, p. 235.
Bernard (Mme N.) et Magrou (J.). *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 9e série, **14**, 1911, p. 252.
Bouget (J.). *C. R. Acad. Sciences*, **199**, 1934, p. 1154.
Burgeff (H.). Mycorhiza, *in Manual of Pteridology*, de F. Verdoorn, La Haye (1938).
Butler (E. J.). *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **22**, 1939, p. 274.
Costantin (J.). *C. R. Acad. Agric. de France*, 17 mai 1933, p. 592.
Costantin (J.) et Magrou (J.). *C. R. Acad. Sciences*, **182**, 1926, p. 26.
Costantin (J.) et Magrou (J.). *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 10e série, **17**, 1935, p. 37.
Costantin (J.), Magrou (J.), Bouget (J.) et Jaudel (V.). *C. R. Acad. Sciences*, **198**, 1934, p. 1195.
Costantin (J.), Magrou (J.) et Bouget (J.). *C. R. Acad. Sciences*, **199**, 1934, p. 1547.
Crépin (Ch.), Bustarret (J.) et Chevalier (R.). *Ann. épiphyties*, nouv. série, **4**, 1938, p. 449.
Dop (P.) et Gautié (A.). *Manuel de technique botanique*, 2e édition, 1928.
Jones (F. R.). *Journ. Agric. Res.*, **29**, 1924, p. 459.
Lapicque (L.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, **7**, 1925, p. 621.
Laurent (E.). *Bull. Soc. Roy. Bot. de Belgique*, **26**, 1888.
Laurent (J.). *Rev. gén. Bot.*, **16**, 1904.
Lihnell (D.). *Symbolae botanicae upsalienses*, Upsal, 1939.
Magrou (J.). *C. R. Acad. Sciences*, **158**, 1914, p. 50.
Magrou (J.). Ces *Annales*, **32**, 1918, p. 37.
Magrou (J.). *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 10e série, **3**, 1921, p. 181.
Magrou (J.). *C. R. Acad. Sciences*, **201**, 1935, p. 1038.
Magrou (J.). *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 10e série, **19**, 1937, p. 359.
Magrou (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 793.
Magrou (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 1163.
Magrou (J.). *C. R. Acad. Sciences*, **208**, 1939, p. 923.
Magrou (J.). *Rev. gén. Bot.*, **52**, 1940.
Magrou (J.) et Bouget (J.). *C. R. Acad. Sciences*, **207**, 1938, p. 1438.
Magrou (J.), Legroux (R.) et Bouget (J.). *C. R. Acad. Sciences*, **209**, 1939, p. 1005.
Magrou (J.) et Magrou (Mme M.). *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 10e série, **15**, 1933, p. 303.
Magrou (J.) et Magrou (Mme M.). *C. R. Acad. Sciences*, **211**, 1940, p. 234.
Molliard (M.). *C. R. Acad. Sciences*, **141**, 1905, p. 389.
Molliard (M.). *Rev. gén. Bot.*, **19**, 1907, p. 241.
Molliard (M.). *C. R. Acad. Sciences*, **161**, 1915, p. 531.
Molliard (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **83**, 1920, p. 138.
Molliard (M.). *C. R. Acad. Sciences*. **208**. 1939, p. 1257.

Molliard (M.) et Crépin (A.). *C. R. Acad. Sciences*, **199**, 1934, p. 1027.
Parmentier (A.). *Mém. Soc. Roy. Agric.*, 30 mai 1786.
Pinoy (E.) et Magrou (J.). *Bull. Soc. Bot. de France*, **59**, 1912, p. 609.
Salaman (R. N.). *Journ. Roy. Hortic. Soc.*, **62**, 1937, p. 61.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

Aspect microscopique du champignon symbiotique, chez un plant de Pomme de terre provenant d'un tubercule primaire aseptique, planté dans les terrains à mycorhizes du Pic du Midi.

A gauche, coupe longitudinale d'une mycorhize montrant, à un faible grossissement, la topographie de l'infestation. Le champignon occupe les deux assises cellulaires moyennes de l'écorce de la racine et, suivant une règle constante, respecte le cylindre central. × 68.

A droite, détail plus grossi de la figure précédente, montrant le mycélium du champignon, qui forme des pelotons et des arbuscules intracellulaires × 511. (Cliché Jeantet.)

PLANCHE II

En haut, coupe transversale d'un tubercule aseptique (var. « Maréchal Franchet d'Esperey ») provenant d'une graine semée sur solution de Knop glucosée à 1 p. 100. A droite de la figure, la coupe intéresse un bourgeon. × 76.

En bas, détail plus grossi de la figure précédente, montrant la présence, dans les cellules, de nombreux grains d'amidon. × 572. (Cliché Jeantet.)

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DES BACILLES PARATUBERCULEUX

III. — PROPRIÉTÉS TOXIQUES ET SENSIBILISANTES

par R. LAPORTE.

(*Institut Pasteur,*
Laboratoire de recherches sur la Tuberculose.)

Dès les premières recherches expérimentales sur le pouvoir pathogène des bacilles paratuberculeux pour les animaux homéothermes, on a mis en évidence, chez certains de ces germes, des propriétés tuberculigènes dont l'intensité est particulièrement accusée lorsqu'on inocule les corps microbiens après enrobage dans un vecteur gras (beurre, paraffine...). Dans un travail antérieur nous avons émis l'hypothèse que l'action pathogène ainsi révélée découle directement des qualités toxiques propres aux substances libérées *in situ* par les bacilles introduits dans les tissus [**1**].

L'étude des propriétés toxiques des corps microbiens de bacilles paratuberculeux n'a guère retenu, jusqu'à présent, l'attention des chercheurs. La raison en est que la toxicité de ces germes est très faible ou, du moins, que ses effets ne deviennent apparents qu'à la condition d'utiliser une technique expérimentale appropriée. C'est ainsi que lorsque la désintégration des corps microbiens s'opère *in vivo*, d'une manière fractionnée et durable, ce qui s'obtient en les inoculant enrobés dans une substance grasse protectrice, il se forme des lésions particulièrement intenses en raison de la façon spéciale dont s'exerce alors l'action toxique des bacilles.

Une première condition pour l'étude rationnelle des qualités toxiques des bacilles paratuberculeux est de n'employer pour les expériences que des animaux neufs et spécialement non tuberculeux. L'inoculation de germes acido-résistants saprophytes à un organisme sensibilisé par une imprégnation bacil-

laire antérieure met, en effet, en jeu des phénomènes particuliers se rattachant aux manifestations para-allergiques et qui sont tout à fait indépendants des propriétés toxiques primaires des bacilles inoculés.

En dépit de ces considérations, les recherches poursuivies jusqu'ici ont été presque toutes opérées chez des animaux tuberculeux à qui on inoculait des bacilles acido-résistants saprophytes par voie cérébrale, sous-cutanée ou péritonéale (Borrel, Pinoy et Burnet ; Irimescu ; A. Boquet et Nègre ; Alexa). Bien que les animaux employés pour ces expériences fussent hypersensibles, ils n'ont que très faiblement réagi aux bacilles paratuberculeux dont la toxicité est apparue pour eux très réduite. Alexa [2] a expérimenté également chez des cobayes normaux à qui elle injectait par voie péritonéale de 50 à 250 milligrammes de corps microbiens de bacilles de la fléole. Tous les animaux résistèrent. Cantacuzène [3] a, par contre, constaté pour les mêmes germes de la fléole, une certaine toxicité propre : 1/2 culture sur gélose inoculée dans le péritoine d'un jeune cobaye le tue en moins de vingt-quatre heures. Les corps bacillaires dégraissés paraissent, entre les mains de cet auteur, au moins aussi toxiques; 10 milligrammes de corps microbiens délipoïdés ont déterminé une hyperthermie durable ainsi qu'un amaigrissement très sensible.

Nous avons repris l'étude des propriétés toxiques des bacilles paratuberculeux à l'aide de techniques qui n'avaient pas été utilisées jusqu'ici pour ces bacilles. Nos résultats ont été beaucoup plus nets que ceux des auteurs précédents ; ils établissent d'une manière incontestable l'existence d'une toxicité réelle des bacilles acido-résistants saprophytes.

Etude des propriétés toxiques des corps microbiens de bacilles paratuberculeux.

Lorsqu'on veut définir la toxicité des différentes espèces du genre *Mycobacterium*, et en particulier celle du bacille tuberculeux, on se heurte à des difficultés considérables. Si nombreuses qu'aient été, jusqu'à ce jour, les recherches entreprises pour mettre en évidence des poisons tuberculeux, aucun

fait indiscutable n'a été observé qui nous autorise à affirmer l'existence de substances bien définies provenant des bacilles et répondant à la conception classique des toxines microbiennes.

Les tuberculines et les paratuberculines sont pratiquement sans effets appréciables chez l'animal sain ; on n'a pas, non plus, isolé d'endotoxine tuberculeuse comparable aux antigènes glucido-lipidiques toxiques préparés par Boivin pour d'autres espèces microbiennes telles les *Salmonella*. Le seul fait indiscutable légitimant la conception d'une toxicité de certains bacilles acido-résistants c'est que les produits libérés par les corps microbiens tués sont doués de propriétés irritantes pour les tissus qui sont le théâtre de la désintégration bacillaire. Mais il faut insister particulièrement sur le fait que la façon dont cette désintégration s'opère influe d'une manière considérable sur les réactions tissulaires qui s'ensuivent. Ainsi les bacilles tuberculeux morts et certains bacilles paratuberculeux également tués se montrent capables, on le sait, de créer des lésions très graves lorsqu'on modifie les processus de résorption dont ils sont l'objet *in vivo* en les protégeant par un enrobage gras contre un épuisement rapide de leur pouvoir agressif. C'est dire que bien plus que la toxicité réelle des substances libérées par les bacilles morts le mode de libération de ces substances joue un rôle dans l'apparition d'une réaction tuberculigène.

Pour évaluer exactement la toxicité propre des corps microbiens tués il faut donc faire varier les conditions expérimentales qui permettent d'en apprécier les effets. Nous avons utilisé pour cela deux techniques différentes. La première concerne l'action toxique précoce qui suit l'introduction dans les tissus d'un nombre important de bacilles tués. Il se produit, dans ce cas, une libération massive de substances plus ou moins irritantes provoquant *in situ* une réaction inflammatoire aiguë, d'intensité variable suivant l'espèce bacillaire. Avec les bacilles paratuberculeux, la réaction locale ainsi obtenue nécessite, pour être apparente, un choix judicieux de son siège. C'est ainsi qu'il est possible de déclencher des troubles organiques très graves et même mortels en inoculant les corps microbiens par voie cérébrale. On peut aussi

juger de l'importance du pouvoir phlogogène des bacilles paratuberculeux en les inoculant, à dose élevée, dans le derme du cobaye, mais cette voie est beaucoup moins sensible que la précédente.

Afin d'éprouver la capacité d'une souche de bacilles acido-résistants à provoquer la formation de tissu tuberculeux grâce à une irritation prolongée exercée dans les tissus par les corps microbiens morts, il est nécessaire, soit d'avoir recours à la technique d'inoculation dans l'huile de paraffine, soit de multiplier les injections, par la même voie, de doses modérées ou faibles de culture tuée afin d'entretenir longuement l'action irritante des bacilles en un même point de l'organisme.

1° Effets toxiques précoces.

Parmi les différentes souches de bacilles acido-résistants saprophytes d'origine diverse qui nous ont servi à l'étude du pouvoir toxique, quatre ont retenu spécialement notre attention, dont trois en raison de leur toxicité élevée et la quatrième : celle de la fléole, parce qu'elle est le plus souvent choisie comme type du groupe paratuberculeux. Les trois premières sont, par ordre de toxicité décroissante : le bacille P isolé par nous du pus d'un abcès chez un enfant et que nous avons étudié longuement dans notre travail antérieur [1], le bacille du lait de Moeller provenant de la collection du laboratoire et le bacille D 6 isolé par A. Boquet, en 1930, du contenu intestinal d'un enfant.

a) Toxicité par voie cérébrale. — Nous avons utilisé des germes tués par la chaleur humide (une heure à 70°) et pesés après avoir été essorés mais non desséchés. La dose à inoculer était mise en suspension dans le volume fixe de 0 c. c. 2 d'eau physiologique et injectée par voie intracranienne à des cobayes normaux.

La technique de l'injection cérébrale chez le cobaye est des plus simple. Elle s'effectue à travers un tout petit orifice de trépanation pratiqué un peu à côté de la ligne médiane et légèrement en arrière de la transversale unissant les commissures palpébrales postérieures. L'inoculation se fait à l'aide d'une aiguille très fine enfoncée de 4 millimètres environ dans la masse encéphalique. Pour obtenir des résul-

tats comparables il est absolument indispensable de faire les injections sous un volume constant et le plus réduit possible : 0 c. c. 2 est la quantité optima.

Inoculés dans ces conditions, les bacilles P, D 6 et du lait de Moeller se sont révélés très toxiques. Tous les cobayes ayant reçu une dose égale ou supérieure à 2 milligrammes de corps microbiens non desséchés sont morts quelques heures après l'inoculation en présentant des signes de méningo-encéphalite aiguë : torpeur apparaissant une heure environ après l'injection et suivie d'un état comateux avec secousses convulsives ininterrompues. A l'autopsie, le tableau est uniforme : congestion méningée et encéphalique diffuse et intense, poumons farcis de foyers de congestion hémorragique disposés en taches ou d'une manière diffuse, surrénales en général œdématiées et hémorragiques. On note assez fréquemment un peu de congestion des viscères abdominaux et la présence de quelques gouttes de sérosité dans le péritoine.

Lorsqu'on abaisse la dose de culture inoculée au-dessous de 2 milligrammes, la mort rapide des cobayes n'est plus fatale. Jusqu'à 1/5 de milligramme elle survient pourtant chez le plus grand nombre des animaux en moins de vingt-quatre heures; passé ce temps, ceux qui échappent à la phase critique d'encéphalite aiguë survivent d'une manière générale. On observe alors seulement, dans les jours qui suivent, un amaigrissement considérable mais passager.

Trois cobayes ayant reçu par voie cérébrale 1 milligramme de bacilles P tués et qui avaient survécu aux symptômes précoces d'encéphalite ont présenté après sept, douze et quatorze jours une parésie des membres inférieurs prédominant d'un côté et s'accompagnant d'incoordination des mouvements : faux pas nombreux quand l'animal court, gêne très considérable pour redresser le train postérieur lorsqu'il est étendu sur un côté. Le plus atteint a été sacrifié après douze jours ; rien d'anormal ne fut trouvé à l'ouverture du crâne. L'ensemencement du contenu encéphalique sur milieu ordinaire et sur milieu à l'œuf n'a pas donné de culture. Il ne s'agissait donc pas de symptômes infectieux dus à des germes vivants ayant résisté à la température de 70° à laquelle les bacilles inoculés avaient été portés. Les 2 cobayes qui ne furent pas sacrifiés se sont rétablis complètement après une dizaine de jours. Rappelons que A. Boquet et Broca [4] ont observé que les bacilles tuberculeux morts inoculés par voie intrarachidienne à des lapins peuvent produire des paralysies tardives parfois mortelles. Nous avons nous-même constaté que certains bacilles paratuberculeux inoculés vivants, à faible dose, dans le cerveau de

cobayes, sont parfois susceptibles de créer des lésions de méningo-encéphalite mortelle survenant plusieurs jours après l'inoculation. Des expériences analogues ont été effectuées par Bablet, Van Deinse et Schwartz [5], et par Bertrand, Bablet et Bloch [6] avec différentes souches de paratuberculeux qui ont fait preuve d'un pouvoir pathogène élevé quand ils étaient introduits vivants dans l'encéphale de lapins.

Toutes les cultures de bacilles paratuberculeux ne possèdent pas des propriétés toxiques aussi élevées que celles des trois souches dont les effets viennent d'être étudiés. Beaucoup se montrent peu agressives ou même tout à fait inoffensives pour le système nerveux du cobaye. Le type de ces souches est celui de la fléole; les cobayes normaux et en bon état qui reçoivent par voie cérébrale des doses allant jusqu'à 3 milligrammes de bacilles de la fléole tués survivent indéfiniment. On observe seulement une courte période de torpeur durant quelques heures, suivie d'amaigrissement. Quatre souches de bacilles acido-résistants saprophytes que nous avons isolées du sol et une provenant de mouches domestiques se sont montrées aussi peu, ou même moins toxiques, que la souche de la fléole. Par contre, le bacille de Gaiginsky et trois souches de bacilles acido-résistants isolées d'eaux de mares ont témoigné de propriétés toxiques très comparables à celles des bacilles P, du lait de Moeller et D 6. Il est particulièrement remarquable que les qualités agressives des bacilles tuberculeux morts pour l'encéphale de cobaye sont tout à fait comparables à celles des bacilles paratuberculeux du type bacille P. Borrel, Boez et Coulon [7] ont, en effet, provoqué des méningo-encéphalites suraiguës rapidement mortelles par inoculation cérébrale au cobaye de 1 milligramme de corps microbiens desséchés appartenant à différentes souches, virulentes ou non, de bacilles tuberculeux humains ou bovins. Ces expériences rapprochées des nôtres sur les bacilles paratuberculeux montrent, avec évidence, que la toxicité des substances libérées *in vivo* par les bacilles ne constitue pas l'unique facteur de la virulence microbienne.

b) Toxicité par voie dermique. — Le seul avantage de la voie intracutanée pour la recherche de la toxicité bacillaire est de permettre d'apprécier aisément l'intensité de la réac-

tion inflammatoire qui fait suite à l'introduction dans les tissus de corps microbiens ayant des propriétés irritantes. C'est une voie qui est d'ailleurs infiniment moins sensible que la voie cérébrale.

En inoculant des doses de l'ordre de 5 milligrammes de bacilles morts dans la peau de cobayes normaux, on observe, avec la plupart des souches, entre la septième et la vingt-quatrième heure, l'apparition d'un épaississement rouge plus ou moins étendu de la peau. Souvent l'inflammation est assez intense pour aboutir à la nécrose : au centre de la plaque érythémateuse une phlyctène à contenu purulent apparaît, bientôt remplacée par une petite plaque de nécrose noirâtre, localisée.

Certains bacilles acido-résistants saprophytes sont plus irritants, tel est le cas du bacille P. Chez les cobayes neufs recevant 5 milligrammes de corps microbiens tués dans le derme on observe, après vingt-quatre heures, une plaque de nécrose blanche de 5 à 15 millimètres de diamètre entourée d'une auréole hémorragique et reposant sur une large papule rouge infiltrée. Dans les jours qui suivent, il se constitue un placard de sphacèle noirâtre qui tombe, faisant place à une ulcération dont la cicatrisation s'opère assez rapidement.

2° Effets toxiques tardifs.

Lorsque l'on introduit, à l'exemple de Bablet, Van Deinse et Schwartz [5] certains bacilles paratuberculeux, à dose élevée (1 milligramme au minimum) dans le cerveau de cobayes normaux il arrive assez fréquemment que la mort des animaux survienne après une période de latence plus ou moins longue. Avec des bacilles morts, nous avons relaté des observations analogues de troubles tardifs d'ordre paralytique qui se sont terminés d'ailleurs par la guérison. On peut déduire de ces faits que les effets toxiques exercés par certains bacilles acido-résistants saprophytes peuvent ne se manifester qu'après une incubation de quelques jours. En rapprochant cette constatation des résultats des expériences sur l'action de renforcement des corps gras vis-à-vis des lésions dues aux bacilles paratuberculeux, résultats qui révèlent que les bacilles protégés par un enrobage gras sont beaucoup plus tuberculigènes

que les bacilles libres et produisent, *après quelques jours*, des altérations très importantes, il semble logique de conclure que les bacilles présents dans les tissus libèrent des substances irritantes dont l'action ne devient sensible que si leur libération s'effectue pendant un temps assez prolongé. C'est la conclusion à laquelle nous sommes arrivé dans un travail antérieur.

Il est aisé de réaliser expérimentalement une irritation durable, en certains points de l'organisme, par des bacilles paratuberculeux tués sans recourir à l'artifice d'une protection des corps microbiens par un enrobage gras. En répétant, à plusieurs reprises, des inoculations intraveineuses de corps bacillaires, on assure l'entretien de l'action toxique que ces germes sont capables de produire dans les organes où ils vont se fixer électivement : poumons en premier lieu.

Les cobayes et les lapins auxquels on inocule en une seule fois des doses élevées de bacilles paratuberculeux (de l'ordre de 50 milligrammes pour le cobaye et de 100 milligrammes pour le lapin) ne manifestent aucun signe réactionnel si ce n'est, assez souvent, un amaigrissement passager. Néanmoins, avec certaines souches particulièrement toxiques, tel que le bacille P, il arrive exceptionnellement que des lapins ayant reçu 100 milligrammes de corps microbiens meurent après trois à quatre semaines en présentant des lésions pneumoniques d'un type particulier sur lequel nous allons revenir dans la suite.

Si une seule injection de corps microbiens par voie veineuse ne suffit généralement pas pour produire des lésions mortelles, il n'en est pas de même chez le lapin lorsqu'on répète les injections. Avec le bacille P, des inoculations au rythme de deux injections de 10 milligrammes de corps microbiens par semaine, entraînent la mort des lapins entre la troisième et la quatrième semaine dans 75 p. 100 des cas ; des injections de 15 milligrammes dans 100 p. 100 des cas. Avec la souche D 6, il faut injecter au moins 20 milligrammes de corps microbiens à chaque injection bihebdomadaire pour tuer les animaux. Il en va de même pour le bacille du lait de Moeller. Le bacille de la fléole est moins toxique, il est nécessaire d'atteindre des doses de 70 à 100 milligrammes par injection. Dans tous les

cas où des doses suffisantes sont utilisées, la mort survient après trois à quatre semaines et les symptômes présentés par les animaux sont identiques.

Dès la troisième ou quatrième injection on observe un amaigrissement progressif et la mort survient entre le vingtième et le trentième jour précédée par l'apparition d'une dyspnée violente avec polypnée. A l'autopsie, on est frappé par l'intensité des lésions pulmonaires ; tout le tissu des poumons apparaît très dense et ne s'affaisse plus à l'ouverture du thorax. L'aspect des poumons est particulier, leur couleur est uniformément grise ou d'un gris rosé, on ne distingue plus, à la loupe, le piqueté alvéolaire ; la consistance du tissu pulmonaire est ferme, il ne crépite plus sous le doigt qui le presse et son aspect est légèrement translucide, comme vitreux. On distingue souvent à la surface de l'organe des parties plus condensées formant de minces stries opaques disposées en réseau à mailles irrégulières. Un morceau de poumon tombe, en général, au fond de l'eau.

A l'examen des coupes histologiques, on constate qu'il s'agit d'un véritable processus pneumonique. Presque tous les alvéoles sont envahis par un exsudat fibrino-leucocytaire qui oblitère également les canaux alvéolaires et certaines bronchioles terminales. Les grosses bronches sont libres ; on note seulement à leur niveau une infiltration lymphocytique diffuse de l'adventice et de la sous-muqueuse ainsi qu'une hypertrophie des nodules lymphoïdes.

En certaines zones, les lésions sont moins intenses, la lumière des bronches est libre et de nombreux alvéoles ne contiennent que quelques cellules et de la fibrine ; leur aspect clair contraste avec la couleur sombre d'autres alvéoles remplis de cellules inflammatoires étroitement tassées parmi lesquelles les lymphocytes sont particulièrement nombreux. Ces alvéoles sombres sont, ou bien répartis sans ordre, ou groupés pour former de petits blocs compacts ; mais on ne rencontre pas, néanmoins, d'aspects nodulaires typiques. A un plus fort grossissement on constate deux types d'altérations : d'une part un épaississement très marqué des cloisons alvéolaires réalisé par la métaplasie de l'épithélium dont les cellules, très turgescentes, contiennent des noyaux volumineux,

clairs, ovalaires, souvent multiples ; et, d'autre part, une invasion de la lumière des alvéoles par de grosses cellules histiocytaires semblables aux cellules de revêtement et auxquelles se joignent des leucocytes : polynucléaires, lymphocytes, plasmocytes, mastzellen ainsi que des hématies. Il existe à côté de ces lésions des altérations importantes au niveau de nombreux petits vaisseaux dont la lumière est entièrement obstruée par des histiocytes étroitement tassés les uns contre les autres et entourés par une fine membrane fibrillaire conjonctive représentant la paroi du vaisseau. Autour, siège une infiltration lymphocytique souvent intense ; parfois la paroi fibreuse, elle-même, a éclaté. Les alvéoles qui entourent ces nodules vasculaires sont particulièrement atteints ; ce sont ces images qui, au faible grossissement, réalisent grossièrement l'aspect de nodules.

Par places, on trouve des cellules géantes typiques, avec une couronne de noyaux et des macrophages contenant de nombreuses enclaves, des débris de noyaux leucocytaires et du pigment hématique. Nulle part on ne rencontre d'altérations caséeuses.

Sur les coupes colorées au Ziehl, les bacilles acido-résistants paraissent rares, il y en a quelques-uns phagocytés par des macrophages, leur aspect est en général granuleux ou pulvérulent ; quelques macrophages en contiennent de petits amas; on ne trouve pas de bacilles libres. Dans le cytoplasme de certaines cellules il existe des granulations acido-résistantes qui peuvent représenter des résidus de bacilles désintégrés. A signaler que si des cellules géantes contiennent des bacilles, il y en a de plus nombreuses qui n'en renferment pas.

Sur les coupes colorées par les méthodes électives des éléments du tissu conjonctif : trichromique de Masson, coloration à l'Elastine H, on met parfaitement en évidence les lésions développées à l'intérieur des vaisseaux en révélant spécialement la mince membrane fibrillaire qui marque seule l'emplacement de la paroi du vaisseau obstrué. Cette membrane dessine des images arrondies, ovalaires ou en forme de ruban suivant le sens dans lequel le vaisseau a été intéressé par la coupe. Parfois, parmi les cellules histiocytaires serrées les unes contre les autres qui ont envahi la lumière vasculaire

il existe, au centre, un amas d'hématies altérées et enrobées de fibrine : coupe du caillot qui s'était formé à ce niveau. Contrastant avec l'aspect hétérogène des exsudats alvéolaires (qui contiennent à côté des histiocytes prédominants des polynucléaires, des lymphocytes et des plasmocytes), les lésions d'endo-vascularite ne sont constituées que par de grosses cellules histiocytaires à cytoplasme granuleux, à noyau périphérique, clair, ovalaire, souvent multiple ; le contour de ces cellules est très irrégulier, leur cytoplasme se trouve condensé à la périphérie où il présente un aspect beaucoup plus sombre qu'au centre.

Certains organes atteints de pneumonie toxique offrent des lésions particulièrement massives et la condensation de l'ensemble du parenchyme est telle que le diagnostic de poumon ne peut pas être porté à première vue. Le tissu pulmonaire a l'aspect d'une masse cellulaire compacte, très riche en noyaux, dont la plupart appartiennent à des lymphocytes ; mais, en examinant attentivement, on y retrouve les lésions d'endo-vascularite encerclées par une membrane fibrillaire ainsi que les cloisons interalvéolaires qui sont encore indiquées par l'ordonnance, reconnaissables des cellules de l'épithélium et par la persistance des fibres conjonctives et élastiques. L'architecture pulmonaire est donc ainsi toujours conservée, mais l'infiltration des lumières alvéolaires est totale. Malgré l'intensité de ces lésions, les cadavres bacillaires acido-résistants ne sont pas très nombreux, on en retrouve toujours néanmoins, preuve formelle que leur disparition ne s'opère pas très rapidement.

Si la dose de bacilles inoculés à chaque injection n'est pas assez élevée pour entraîner la mort de l'animal, ou bien si on interrompt à temps ces injections, les lésions qui se constituent ne présentent pas un caractère aussi intense que celles que nous venons de décrire, mais conservent le même aspect essentiellement diffus et n'aboutissent pas à la formation de nodules. Sur des coupes de poumons d'un animal sacrifié trois semaines après la mort de tous les lapins du même lot qui avaient reçu, comme lui, des inoculations répétées de bacilles P tués, par voie veineuse, on peut se rendre compte de l'opération de nettoyage des lésions pneumoniques de la période

d'état. Tous les alvéoles contiennent encore des cellules libres mononucléées mais à cytoplasme beaucoup moins turgescent et granuleux que celui des histiocytes intra-alvéolaires de l'acmé de la réaction. Il existe encore de nombreuses cellules géantes. L'épithélium de revêtement a retrouvé son aspect habituel ; on note seulement une congestion intense des capillaires ; les lésions de vascularite ont disparu entièrement, mais la lumière des bronchioles et des grosses bronches renferme en abondance un exsudat fibrino-cellulaire provenant des canaux alvéolaires et représentant l'ancien contenu des alvéoles. On note une grande quantité de pigment hématique dans l'intérieur de certaines cellules libres contenues dans les alvéoles. En somme, malgré l'énorme intensité des lésions de la période d'état, la guérison s'est opérée parfaitement comme il est de règle à la suite de tous les processus pneumoniques n'ayant pas atteint une intensité suffisante pour entraîner, par suite de raisons exclusivement mécaniques, la mort de l'animal.

En résumé, l'étude histologique des altérations pulmonaires mortelles consécutives à des inoculations répétées au lapin, de certains bacilles paratuberculeux tués, suffisamment toxiques, montre que l'on a affaire à des lésions du type pneumonique constituées par une infiltration massive et diffuse de la grande majorité des alvéoles. En outre, on observe constamment une atteinte des petits vaisseaux dont la lumière est entièrement obstruée par des histiocytes provenant, selon toutes probabilités, de l'hyperplasie de l'endothélium. Constituées lentement ces lésions seraient susceptibles, malgré leur intensité, de régresser entièrement sans laisser de traces si l'obstruction mécanique de la plus grande partie du parenchyme pulmonaire était compatible avec la survie de l'animal. On reconnaît là la caractéristique principale des altérations causées par les bacilles acido-résistants saprophytes. Ces altérations peuvent atteindre une intensité considérable (par exemple lorsque l'action de ces bacilles s'exerce en présence de certains corps gras) et sont alors capables de tuer l'animal si leur étendue est assez grande ou leur siège judicieusement choisi. Mais, s'il n'en est pas ainsi, elles régressent toujours spontanément et aboutissent à la guérison.

Propriétés sensibilisantes des bacilles paratuberculeux.

Très tôt après la découverte des bacilles acido-résistants saprophytes, on leur appliqua les techniques qui avaient permis à Robert Koch de mettre en évidence l'hypersensibilité des sujets tuberculeux aux bacilles homologues et aux produits que ces germes élaborent dans les milieux de culture. Ledoux-Lebard [8] prépara une paratuberculine à partir des cultures en bouillon glycériné du bacille piscaire de Dubard, Bataillon et Terre et constata que ce produit donne une réaction thermique chez le cobaye tuberculeux. Irimescu [9] a obtenu, à l'aide du procédé de Koch, des paratuberculines à partir de cultures du bacille pisciaire de Dubard et des bacilles du beurre de Rabinowitsch, de la fléole, de l'orvet et du smegma. Ces produits ont provoqué une réaction thermique semblable à celle que produit la tuberculine injectée par voie sous-cutanée à l'homme ou au cobaye tuberculeux.

Dans la suite, les expériences se multiplièrent et conclurent dans le même sens. Entre les mains de Br. et E. Lange [10] diverses paratuberculines ont occasionné, chez le cobaye tuberculeux, des réactions dermiques identiques à celles que produit la tuberculine. Néanmoins, les paratuberculines doivent être injectées à une dose notoirement supérieure à celles qui suffisent pour la tuberculine. Dietrich [11] précisa qu'il est nécessaire d'injecter de dix à vingt fois plus de paratuberculine provenant du bacille de la tortue ou des animaux à sang froid pour déclencher chez les cobayes tuberculeux des réactions dermiques analogues à celles que provoque la tuberculine humaine ou bovine. D'après A. Boquet et Nègre [12] les bacilles paratuberculeux de Grassberger ou de la fléole sont capables de conférer au cobaye une certaine sensibilité vis-à-vis des bacilles tuberculeux morts ou de la tuberculine. Inversement, les mêmes bacilles saprophytes provoquent un phénomène de Koch chez le cobaye tuberculeux mais à condition d'être inoculés à doses élevées. Crawford [13] obtint des réactions dermiques inconstantes et atypiques avec la tuberculine chez des cobayes sensibilisés, par voie péritonéale, à l'aide de bacilles paratuberculeux saprophytes. Alexa [2] observa une

action des paratuberculines analogue à celles de la tuberculine chez des cobayes ou des lapins inoculés avec des bacilles de la fléole ou de Grassberger. Mais si ses expériences sont en faveur de la réalité du pouvoir sensibilisant des bacilles para tuberculeux, elles montrent aussi que ce pouvoir est beaucoup moins marqué que celui des bacilles tuberculeux. Long [**14**] a obtenu des réactions importantes à l'examen histologique, en injectant des paratuberculines dans le testicule d'animaux tuberculeux (spermatocyto-réaction).

Plus récemment, Thomson [**15**], en utilisant la technique d'inoculation de bacilles émulsionnés dans de l'huile de paraffine a pu, la première, mettre en évidence une hypersensibilité très vive conférée au cobaye par de nombreux bacilles acido-résistants saprophytes. Ces germes étaient classés en trois groupes d'après leurs caractères de culture ; l'auteur a vérifié qu'il existait une certaine spécificité de l'allergie tuberculinique ; les paratuberculines provenant des différents bacilles d'un même groupe peuvent se montrer totalement inactives chez les animaux inoculés avec les germes d'un autre groupe. Malgré la très forte sensibilité obtenue avec des bacilles acido-résistants saprophytes injectés en suspension huileuse, les animaux ainsi allergisés n'ont jamais réagi à la tuberculine. Harris et Schattenberg [**16**] ont, de même, constaté un état d'allergie assez étroitement spécifique chez les lapins inoculés avec quatre souches différentes de bacilles paratuberculeux tués par la chaleur. Les épreuves étaient réalisées par voie dermique avec des suspensions de corps bacillaires morts.

Nous avons repris ces recherches en utilisant le procédé de sensibilisation mis au point par Thomson qui permet de renforcer d'une manière considérable le pouvoir allergisant des bacilles paratuberculeux et en recourant à une technique nouvelle qui rend possible l'obtention de paratuberculines très actives.

Les Paratuberculines.

Tous les auteurs qui ont étudié les propriétés réactionnelles des liquides de culture des bacilles acido-résistants saprophytes ont préparé les paratuberculines avec des cultures en

bouillon glycériné ou milieu synthétique âgées de quelques semaines (trois à quatre au maximum), temps largement suffisant pour obtenir des cultures ayant atteint leur plein développement. En étudiant la souche P de bacilles paratuberculeux provenant du pus d'un abcès froid chez un enfant, nous avons observé que les cultures de ce germe subissent, après plusieurs mois, un processus très particulier de lyse. La dégénérescence des cultures s'accompagne de la libération de protéides doués d'activité tuberculinique considérable. Ce phénomène n'est pas particulier à cette souche mais peut être obtenu avec une intensité variable pour d'autres bacilles paratuberculeux [**17**].

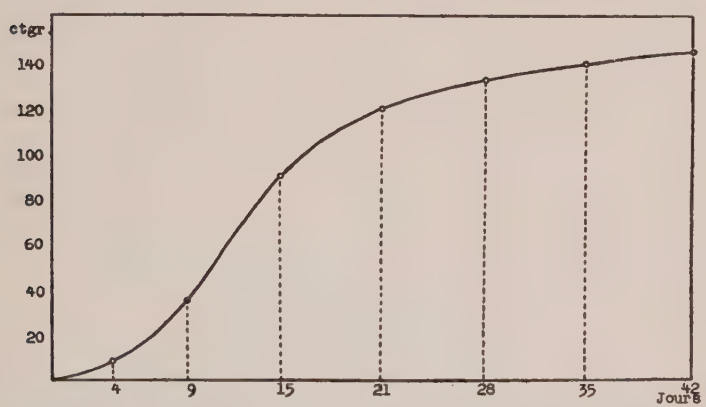
Après sept à huit semaines, au minimum, des cultures du bacille de la fléole ou du bacille du lait de Moeller ont pris un aspect particulier, surtout si elles ont été conservées à l'étuve à 37° pendant tout ce temps. Sur pomme de terre glycérinée, elles forment une couche plate, humide, brillante, de couleur brune ou jaune brunâtre (fléole), paraissant imbibée de liquide. Le bouillon du fond du tube est recouvert d'un voile qui semble d'aspect normal, mais, si on en prélève une parcelle à la spatule, on se rend compte que ce voile est devenu particulièrement cohérent et, qu'au-dessous de la couche sèche, il en existe une autre, épaisse, d'aspect gélatineux, filant comme du mucus, élastique et qu'on a beaucoup de peine à ramener avec la spatule. On observe la même consistance glaireuse de la culture développée à la surface de la pomme de terre. Dans la suite, ces modifications s'accentuent encore.

Avec le bacille P il se produit, plus tardivement, des phénomènes de même ordre. Après plusieurs mois, la dégénérescence glaireuse des cultures sur pomme de terre est telle qu'il devient presque impossible de prélever un fragment de la couche microbienne dont la consistance gluante et élastique rappelle celle des cultures du bacille de la morve.

Sur les frottis colorés au Ziehl, les cultures âgées montrent des modifications importantes de la morphologie des bacilles. Les bâtonnets acido-résistants se raréfient et le fond des préparations est recouvert par une substance abondante paraissant amorphe, colorée en bleu, et dans laquelle la structure bacillaire a disparu. Pour le bacille de la fléole cette substance

bleue a l'aspect du mucus ou de la fibrine, formant parfois un réseau. Avec le bacille du lait de Moeller, elle fournit des images cotonneuses ; elle a un aspect poussiéreux sur les frottis des cultures lysées du bacille P.

Poursuivant l'étude de ce phénomène, nous avons observé que les cultures modifiées dans leur aspect par le vieillissement conservent intactes les propriétés toxiques des bacilles jeunes de la même espèce. Si on fait macérer dans une faible quantité d'eau physiologique, à 37°, pendant quelques heures, des cultures lysées provenant de pomme de terre glycérinée,



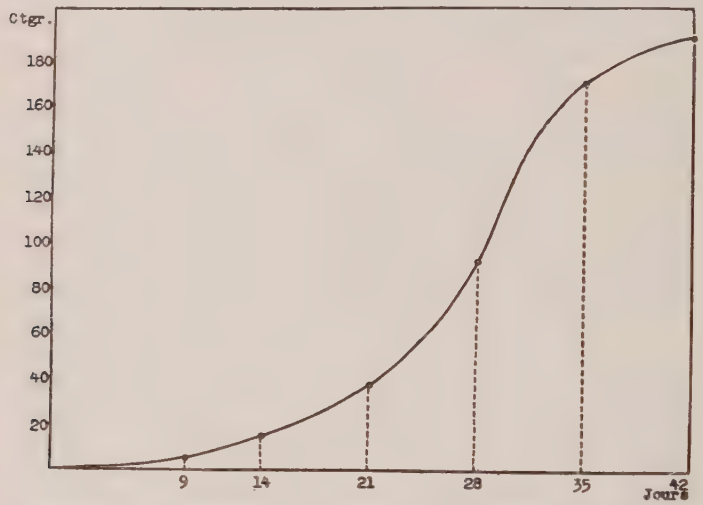
Courbe 1. — Libération de protéides dans le milieu de Sauton par les bacilles du lait de Moeller.

on obtient un liquide de macération qui, séparé des bacilles par filtration, ne produit pas de réaction appréciable lorsqu'on l'injecte dans la peau de cobayes sains, mais se comporte comme une tuberculine assez active quand il est introduit dans le derme de cobayes tuberculeux allergiques. Mêmes résultats avec le bouillon filtré du fond des tubes de cultures sur pomme de terre.

Or, les filtrats de cultures de ces bacilles paratuberculeux en milieux liquides (Sauton ou bouillon glycériné) ne possèdent qu'une activité tuberculinique très réduite (bacille du lait ou de la fléole) ou même nulle (bacille P) lorsque le développement microbien ne s'est poursuivi que pendant trois à cinq semaines. Tout se passe donc comme si une libération progres-

sive de substances comparables dans leurs propriétés à la tuberculine se produisait au sein des cultures âgées par suite des phénomènes lytiques dont elles sont l'objet.

L'expérience nous a montré que des cultures en milieu liquide du bacille de la fléole, du bacille du lait de Moeller ou du bacille P ayant séjourné quatre à cinq mois, au minimum, à l'étuve à 37°, puis filtrées sur papier afin d'éliminer les corps bacillaires, se comportent envers les animaux allergiques



Courbe 2. — Libération de protéides dans le milieu de Sauton par les bacilles de la fléole.

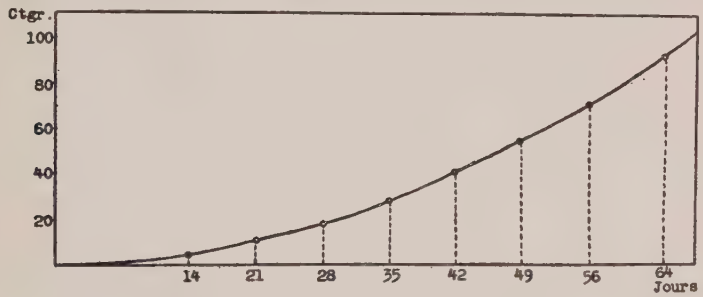
comme des filtrats de culture de bacilles tuberculeux. Le même phénomène a été observé, avant nous, par Van Deinse [18] au sujet d'un bacille saprophyte acido-résistant provenant d'un robinet d'eau. Ce bacille a donné une « tuberculine » active dans les cultures ayant séjourné un an à la température du laboratoire.

En même temps que des substances analogues à la tuberculine apparaissent dans les cultures âgées de certains bacilles paratuberculeux, les germes qui s'y sont développés subissent les phénomènes d'autolyse que nous avons décrits et qu'un examen sur frottis met aisément en évidence (1). La dégé-

(1) Nous avons adopté le terme de lyse pour désigner les phénomènes si spéciaux de dégénérescence dans les cultures âgées des bacilles para-

nérescence bacillaire s'accompagne de la diffusion d'un pigment et de l'apparition d'un trouble dans le milieu. Ce phénomène est particulièrement net pour le bacille du lait.

L'autolyse des cultures libère des protéides dans le milieu ambiant. On peut aisément suivre ce phénomène en procédant à des mesures successives de l'opacification produite par l'acide trichloracétique ajouté aux filtrats dans des conditions déterminées. Le titrage est effectué par la mesure de la densité optique des filtrats précipités à chaud par l'acide en comparaison avec une échelle préparée avec de l'ovalbumine suivant la technique qu'utilisait Mestrezat pour la mesure de l'index



Courbe 3. — Libération de protéides dans le milieu de Sauton par les bacilles de la souche P.

albuminique du liquide céphalo-rachidien. Ce mode de titrage ne peut donner, bien entendu, que des résultats approchés, mais qui paraissent très suffisants pour suivre l'allure d'un phénomène dont la mise en évidence est des plus aisée. Des opérations de contrôle effectuées à plusieurs reprises en pesant le précipité trichloracétique lavé à l'éther et provenant d'une quantité connue de filtrat nous a montré, d'ailleurs, que le coefficient d'erreur introduit par la technique de Mestrezat est faible.

Les courbes I, II et III montrent l'allure du phénomène de libération des protéides pendant les premières semaines de culture en milieu synthétique de Sauton des bacilles du lait,

tuberculeux ; il faut préciser que le choix de cette expression ne présume en rien une interprétation du phénomène, en particulier par action d'un ferment endo- ou extra-cellulaire. Toutes les tentatives pour mettre en évidence l'existence de tels ferments ne nous ont donné d'ailleurs, jusqu'à présent, que des résultats négatifs.

de la fléole et de la souche P. Un examen de ces trois courbes révèle l'identité d'allure du processus de lyse pour les trois souches, mais il apparaît que la vitesse de libération est très variable suivant l'espèce : grande pour le bacille du lait, elle est plus réduite pour celui de la fléole et très lente pour le bacille P. On doit remarquer que c'est aussi dans le même ordre de vitesse décroissante que s'effectue la lyse bactérienne des cultures de ces trois souches, comme on peut le voir en observant les changements successifs d'aspect sur frottis.

La libération de protéides se poursuit pendant fort longtemps à 37° (1 *bis*) et peut atteindre une intensité considérable après plusieurs mois le poids total des protéides libérés dans les ballons pouvant égaler 40 p. 100 et plus du poids sec des bacilles récoltés. Avec le bacille du lait, des filtrats de culture sur Sauton âgées de neuf semaines contiennent, en moyenne, 2 grammes de protéides par litre ; le même taux est atteint en douze semaines pour le bacille de la fléole et après quinze semaines environ pour le bacille P.

Des cultures, à 37°, sur Sauton, âgées de quatre mois des bacilles de la fléole et du lait ont donné des filtrats que nous avons titrés par précipitation à l'acide trichloracétique (au taux de 8 p. 100 du volume total). Le précipité centrifugé, remis en solution dans un égal volume d'eau et précipité à nouveau par l'acide trichloracétique, puis lavé à l'éther et desséché dans le vide sulfurique, a été pesé exactement. Cela nous a permis de connaître avec précision le titre des protéides contenus dans les filtrats. Dans ces conditions, nous avons trouvé les nombres de : 5 gr. 60 de protéides par litre pour le bacille de la fléole et de 4 gr. 80 pour le bacille du lait. Même après plusieurs mois, les cultures du bacille P n'atteignent jamais des titres aussi élevés, la limite étant inférieure à 2 grammes par litre.

Il serait trop long d'entrer dans le détail des nombreuses expériences qui établissent que la lyse des cultures libérant des protéides est soumise à des facteurs variés, très difficiles à préciser et qui font que son intensité diffère considérablement

(1 *bis*) Les cultures maintenues à la température du laboratoire libèrent aussi des protéides doués d'activité tuberculinique, mais la vitesse du processus d'autolyse est plus lente.

suivant les contingences de culture. C'est ainsi qu'agissent d'une manière très nette les conditions de nutrition du germe comme on s'en rend compte à la lecture du tableau I. On peut voir, en particulier, l'action spéciale du glucose qui favorise nettement la dégénérescence bacillaire, ce qui ressort,

TABLEAU I. — **Variation de la quantité de protéides libérée dans les milieux de culture après six semaines à 37° suivant les conditions chimiques de nutrition du bacille du lait de Moeller.**

Milieu de culture :	RAPPORT $\frac{\text{Poids total des protéides libérées}}{\text{Poids des bacilles secs + Poids des protéides}} \times 100$
Liquide de Sauton	16,66
Bouillon de pomme de terre glycériné à 5 p. 100	5
Sauton non glycériné + alcool (5 p. 100)	25
Acétate d'ammoniaque (1 p. 100) + glycérine (5 p. 100)	7,49
Acétate d'ammoniaque (1 p. 100) + glucose (4 p. 100)	18,9
Carbonate d'ammoniaque (0,5 p. 100) + glycérine (5 p. 100)	7,42
Peptone de gélatine (2) [2 p. 100] + glycérine (5 p. 100)	10,3
Peptone de gélatine (2 p. 100) + glucose (4 p. 100)	18,5

d'autre part, de l'aspect particulièrement glaireux des cultures développées sur les milieux où ce sucre constitue la principale source de carbone.

L'intensité de la lyse varie aussi suivant les conditions de respiration : ainsi la production de protéides est proportionnellement plus importante dans les ballons simplement bouchés au coton que dans les ballons capuchonnés de caoutchouc. Il est possible, d'ailleurs, que la concentration du milieu qui se produit par suite de l'évaporation d'une partie du liquide contenu dans les ballons fermés au coton favorise la dégénérescence bactérienne et l'extraction de protéides. Si une telle interprétation est exacte, on peut rapprocher ce phénomène de nos constatations antérieures avec A. Boquet [19] sur l'extraction de la tuberculine à partir des bacilles tuberculeux morts, par macération dans des liquides organiques,

(2) Préparée par hydrolyse acide de la gélatine.

des solutions glucosées ou des suspensions aqueuses de lipoïdes. Dans l'eau physiologique, au contraire, les bacilles ne laissent pas diffuser leur tuberculine.

Les filtrats de cultures âgées, riches en protéides, font preuve d'une activité comparable à celle de la tuberculine lorsqu'on les injecte dans la peau de cobayes allergiques. Cette activité s'accroît parallèlement au taux des protéides, mais non d'une manière étroitement superposable ; on ne peut pas, en effet, la révéler avant la sixième semaine pour les filtrats de culture du bacille P. La présence de paratuberculine active peut être décelée dès la troisième semaine pour le bacille du lait, plus tardivement pour le bacille de la iléole (les filtrats de trois semaines sur Sauton des cultures de ce germe ne donnent que de faibles réactions non nécrotiques).

Pour ces trois souches, l'activité réactionnelle des paratuberculines augmente rapidement avec l'âge des cultures. Avec le bacille P, les filtrats de quatre à cinq mois (en Sauton) contiennent plus de 1 gramme de protéides et sont très actifs ; ils donnent à la dose de 0 c. c. 1 de fortes réactions nécrotiques comparables à celles que produit la même dose de tuberculine brute diluée au 1/10. L'activité de ces filtrats est telle qu'elle se manifeste encore par une réaction nécrotique lorsqu'on utilise des dilutions allant jusqu'au taux de 1/1.000. On peut voir, dans ce fait, une preuve que les propriétés tuberculiniques ne sont pas en rapport direct avec la quantité de protéides présents dans ces liquides, mais plutôt avec la qualité de certaines de ces substances puisqu'une dilution au 1/1.000 de filtrat de quatre mois ne contient que 1 milligr. 2 environ par litre de protéides, taux inférieur à celui des cultures âgées de trois à six semaines qui se montrent néanmoins inactives pour les animaux tuberculeux.

Les phénomènes qui viennent d'être décrits peuvent être observés avec d'autres souches de bacilles paratuberculeux, mais ils revêtent une intensité beaucoup moins forte, pour la plupart des souches. C'est le cas du bacille de la tortue provenant de la collection du laboratoire et de 6 autres souches de bacilles acido-résistants saprophytes à culture lisse isolés d'insectes ou d'eau de mare. Toutes ces souches libèrent après un temps variable (quatre à cinq mois en moyenne) de faibles quan-

tités de protéides dans les milieux. Ces cultures âgées, pauvres en protéides, témoignent d'un pouvoir tuberculinique peu intense pour le cobaye tuberculeux. Les bacilles isolés par Sabrazès et Le Chuiton de deux cas de lymphogranulomatose maligne de l'homme, se sont montrés réfractaires à l'autolyse et dépourvus d'activité réactionnelle pour le cobaye tuberculeux.

Propriétés allergisantes des bacilles paratuberculeux.

Nos expériences ont porté sur quatre espèces de bacilles paratuberculeux : bacille P, bacille de la fléole, bacille du lait de Moeller et bacille D 6 isolé par A. Boquet dans le contenu intestinal d'un enfant. Des lots de 12 cobayes vigoureux et de pelage clair ont été inoculés par voie sous-cutanée avec une suspension dans 1 cent. cube d'huile de paraffine stérile de 1 milligramme (bacille P), de 5 milligrammes (bacilles du lait et D 6) ou de 10 milligrammes (bacille de la fléole) de culture de cinq jours sur gélose glycérinée.

Des témoins recevaient en même temps par voie péritonéale 20 milligrammes des mêmes germes en suspension aqueuse. Pour comparer l'allergie engendrée par les bacilles paratuberculeux avec celle que confèrent les bacilles tuberculeux, nous avons également préparé plusieurs lots de cobayes par une inoculation sous-cutanée de : 1° 1/20.000 de milligramme d'une souche bovine très virulente ; 2° 20 milligrammes de BCG incorporés dans 2 cent. cubes d'huile de paraffine ; 3° 5 milligrammes de bacilles aviaires de haute virulence pour le lapin et la poule ; 4° 20 milligrammes de bacilles bovins virulents tués à 120° et mis en suspension dans 2 cent. cubes d'huile de paraffine.

Après une, deux, trois, quatre semaines, les animaux ont été éprouvés par injection en divers points de la peau des flancs de 0 c. c. 1 de chacune des paratuberculines correspondant aux quatre souches de bacilles étudiées et avec 0 c. c. 1 de tuberculine brute de mammifères diluée au 1/10. Les paratuberculines actives avaient été préparées dans les conditions déjà exposées, c'est-à-dire que nous avons utilisé des filtrats de cultures en Sauton ayant séjourné plusieurs mois à l'étuve à 37°.

TABLEAU II. — **Sensibilité des cobayes tuberculeux aux paratuberculines.**

NUMÉROS des cobayes	TEMPS DES ÉPREUVES APRÈS L'INOCULATION DE 1/20.000 MILLIGRAMME DE B. BOVIN															
	1 semaine				2 semaines				3 semaines				4 semaines			
	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.
1	0	0	0	0	+	+	+	+	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++
2	0	0	0	0	+	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
3	0	0	0	0	+	0	+	+	++	++	++	++	+++	++	+++	+++
4	+	0	0	0	++	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
5	0	0	0	0	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
6	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+++	++	++	+++

Nos résultats sont rapportés en détail pour 6 cobayes de chaque lot dans les tableaux II à VIII (nous avons fait exception pour la souche D 6 qui nous a donné des résultats absolument comparables à ceux des autres souches).

Explication des signes employés dans ces tableaux : 0, réaction nulle après vingt-quatre heures ; + réaction positive faible ou très faible consistant en un léger épaississement œdémateux de la peau, avec ou sans congestion et sans nécrose ; + + réaction positive de moyenne intensité, papule rouge de 10 à 15 millimètres de diamètre avec foyer central de nécrose ; + + + réaction forte ou très forte consistant en

TABLEAU III. — **Sensibilité des cobayes inoculés avec du BCG (20 milligrammes dans 1 cent. cube d'huile).**

NUMÉROS des cobayes	TEMPS DES ÉPREUVES APRÈS INOCULATION															
	1 semaine				2 semaines				3 semaines				4 semaines			
	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.
7	0	0	0	0	+	+	+	0	++	+	+	++	+++	++	++	+++
8	0	0	0	0	+	0	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+++
9	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+++
10	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	++	+	++	++
11	0	0	0	0	+	+	+	+	++	+	+	+	++	++	++	++
12	0	0	0	0	+	0	0	0	++	+	++	++	+++	++	++	+++

TABLEAU IV. — **Sensibilité des cobayes inoculés avec du bacille aviaire.**

NUMEROS des cobayes	TEMPS DES ÉPREUVES APRÈS L'INOCULATION DE 5 MILLIGRAMMES DE BACILLES															
	1 semaine				2 semaines				3 semaines				4 semaines			
	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.
13	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	++	++	++	++
14	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	++	++	++	++
15	0	0	0	0	+	+	0	+	++	+	++	++	+++	++	+++	+++
16	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	++	+	++	++
17	0	0	0	0	+	0	+	+	++	+	++	++	+++	++	+++	+++
18	0	0	0	0	+	+	+	+	++	++	++	++	+++	++	+++	+++

une plaque de nécrose de 10 millimètres de diamètre au minimum reposant sur une large papule infiltrée. Toutes ces réactions étaient examinées vingt-quatre heures après l'épreuve. Les abréviations Tub. ; Fl. ; L. et P. désignent respectivement la tuberculine (Tub.) et les paratuberculines des bacilles de la fléole (Fl.), du lait (L.) et de la souche P.

Il ressort de la lecture de ces tableaux que : 1° Les paratuberculines très riches en protéides que nous avons utilisées se sont montrées d'une activité semblable à celle de la tuberculine brute diluée au 1/10 pour les cobayes inoculés avec des bacilles tuberculeux vivants ou morts, virulents ou

TABLEAU V. — **Sensibilité aux paratuberculines et à la tuberculine de cobayes inoculés avec 1 milligramme de bacilles paratuberculeux P émulsionnés dans 1 cent. cube d'huile de paraffine.**

NUMÉROS des cobayes	ÉPREUVES APRÈS															
	1 semaine				2 semaines				3 semaines				4 semaines			
	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.
19	0	+	0	+	0	+	0	++	0	+	0	+++	+	+	+	+++
20	0	0	0	+	0	0	0	++	0	+	0	+++	0	+	+	+++
21	0	0	0	+	0	0	0	++	+	+	+	+++	+	+	+	+++
22	0	0	0	+	0	0	0	++	0	0	0	+++	+	+	+	+++
23	0	0	0	+	0	+	0	++	0	+	+	+++	0	+	+	+++
24	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	+	+++	+	+	+	+++

TABLEAU VI. — **Sensibilité des cobayes inoculés avec le bacille paratuberculeux du lait (Moeller), 5 milligrammes dans 1 cent. cube d'huile de paraffine.**

NUMÉROS des cobayes	ÉPREUVES APRÈS															
	1 semaine				2 semaines				3 semaines				4 semaines			
	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.
25	0	0	+	0	0	+	+++	+	0	+	+++	+	+	+	+++	+
26	0	0	++	0	0	0	+++	+	0	+	+++	+	0	+	+++	+
27	0	0	+	0	0	0	++	0	0	+	+++	+	0	+	+++	+
28	0	0	++	0	0	0	+++	+	0	+	+++	+	+	+	+++	+
29	0	0	+	0	0	0	++	0	0	0	+++	0	0	0	+++	0
30	0	0	+	0	0	0	++	0	0	0	+++	0	+	+	+++	0

atténués, ou avec des bacilles aviaires ; 2° les bacilles paratuberculeux incorporés dans de l'huile de paraffine ont développé une allergie intense et d'apparition précoce ayant un caractère assez étroitement spécifique pour la souche employée. Nos expériences confirment sur ce point celles de Thomson et de Harris et Schattenberg déjà citées.

On doit remarquer que l'hypersensibilité provoquée par les bacilles tuberculeux a un caractère beaucoup plus étendu ou, en d'autres termes, nettement moins spécifique que celle produite par les bacilles acido-résistants saprophytes. Rappelons que l'absence d'étroite spécificité de l'allergie des sujets tuberculeux a déjà fait l'objet de très nombreux travaux, en particulier en ce qui concerne l'homme. Br. et E. Lange [10] ont signalé que l'homme tuberculeux réagit aussi fortement aux tuberculines issues des bacilles acido-résistants saprophytes de l'eau, de la tortue ou de la fléole qu'à la tuberculine ancienne de Koch. Irimescu [9] a obtenu des réactions thermiques chez l'homme tuberculeux avec diverses paratuberculines équivalentes à celles que produisait la tuberculine chez les mêmes sujets. On connaît, d'autre part, l'hypersensibilité de l'homme et du cobaye tuberculeux à des protéides bactériens issus de bacilles non acido-résistants (pyocyanique et bacille de Friedländer : Roemer [20], Buchner [21], Klemperer [22]; colibacille : Selter [23], P. Bordet [24]; bacilles dysen-

TABLEAU VII. — **Sensibilité des cobayes inoculés avec le bacille paratuberculeux de la fléole, 10 milligrammes dans 1 cent. cube d'huile de paraffine.**

NUMÉROS des cobayes	ÉPREUVES APRÈS															
	1 semaine				2 semaines				3 semaines				4 semaines			
	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.	Tub.	Fl.	L.	P.
31	0	++	0	+	0	+++	+	+	0	+++	+	++	0	+++	+	++
32	0	+	0	0	0	++	0	+	0	+++	0	+	0	+++	+	+
33	0	++	0	0	0	+++	0	+	0	+++	0	+	+	+++	+	+
34	0	++	0	0	0	+++	+	+	0	+++	+	+	0	+++	+	+
35	0	++	0	0	0	+++	+	+	+	+++	+	+	+	+++	+	+
36	0	++	0	+	0	+++	+	++	+	+++	+	++	+	+++	+	++

térique et diphtérique : Sorgo [25]; vibrion avicide : Metchnikoff et Rudenko). En étudiant l'histologie de l'intradermoréaction tuberculinique chez le cobaye, nous avons observé que du bouillon simple ou glycériné provoque chez les cobayes tuberculeux des réactions faibles mais de même type histologique que celles que produit la tuberculine [26]. Tous ces faits établissent avec une grande netteté l'hypersensibilité étendue que confère l'infection tuberculeuse. Il paraît essentiel de ne pas méconnaître cela dans l'étude des réactions cliniques si spéciales des tuberculeux. S'opposant à l'allergie tuberculeuse paraspécifique, l'hypersensibilité intense engendrée par les bacilles paratuberculeux en suspension huileuse fournit, au contraire, un bel exemple d'allergie assez nette-

TABLEAU VIII. — **Sensibilité des cobayes préparés par une inoculation de bacilles tuberculeux morts : 25 milligrammes dans 1 cent cube d'huile de paraffine. 6 cobayes éprouvés 4 semaines après l'inoculation.**

1° Avec la tuberculine au 1/10 : épaississement rouge de 20 millimètres de diamètre après vingt-quatre heures, avec placard central de nécrose de 5 à 15 millimètres;

2° avec la paratuberculine P : résultats analogues;

3° avec les paratuberculines des bacilles du lait et de la fléole : réactions moins vives, épaississement rouge papuleux, sans nécrose centrale sur 4 cobayes, avec une petite plaque de nécrose de 2 à 6 millimètres sur les 8 autres.

ment spécifique que l'on peut rapprocher, par ce caractère, de l'état anaphylactique.

L'allergie engendrée par les bacilles paratuberculeux inoculés en émulsion huileuse conserve pendant très longtemps ses caractères d'intensité et de spécificité. Des cobayes, éprouvés huit mois après l'inoculation de bacilles P, de bacilles du lait ou de la fléole, ont réagi par la formation d'une large papule avec une nécrose centrale de 10 à 15 millimètres de diamètre à la suite d'une injection intradermique de 0 c. c. 1 de paratuberculine homologue. Les paratuberculines hétérologues ou la tuberculine n'ont produit, dans les mêmes conditions, que des réactions faibles, ou même nulles chez certains animaux.

Les cobayes sensibilisés par des bacilles paratuberculeux en suspension aqueuse ont donné après six semaines :

1° Avec la tuberculine : des réactions dermiques négatives ou très faibles ;

2° Avec une paratuberculine active hétérologue : une réaction toujours faible, d'intensité variable, plus forte, en général, qu'avec la tuberculine.

3° Avec une paratuberculine active homologue : une réaction nette, consistant en une papule rouge de 10 à 15 millimètres de diamètre, avec ou sans zone plus ou moins étendue de nécrose centrale.

On voit donc que si l'huile de paraffine a pour effet d'intensifier considérablement l'allergie due aux bacilles paratuberculeux il n'en est pas moins évident que les caractères spécifiques de l'état d'hypersensibilité conféré par ces germes ne sont pas modifiés par la nature de l'excipient.

Toxicité des paratuberculines pour les cobayes tuberculeux. — Des cobayes tuberculisés par inoculation de 1/20.000 de milligramme de bacilles bovins sont éprouvés, six semaines après l'inoculation, par une injection sous-cutanée de 5 cent. cubes de paratuberculine active provenant du bacille du lait, du bacille P ou du bacille de la fléole. Des témoins reçoivent, dans les mêmes conditions, 5 cent. cubes de tuberculine brute diluée au 1/10. Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant :

Avec la paratuberculine du bacille du lait (5 cobayes) :

Meurent en moins de 24 heures	2
Meurent en moins de 48 heures	2
Meurt le 5e jour	1

Avec la paratuberculine P (5 cobayes) :

Meurent en moins de 24 heures	3
Meurt après 48 heures	1
Meurt après 3 jours	1

Avec la paratuberculine fléole (5 cobayes) :

Meurent en moins de 24 heures	2
Meurent en moins de 48 heures.	2
Survit, mais meurt au 7e jour par infection secondaire.	1

Avec la tuberculine (5 cobayes) :

Seul meurt en moins de 24 heures	1
Meurent en moins de 48 heures.	2
Meurt après 3 jours	1
Survit et se rétablit	1

On voit donc que les filtrats de cultures âgées riches en protéides, de certains bacilles paratuberculeux sont susceptibles de se montrer aussi toxiques pour l'animal tuberculeux que la tuberculine vraie. Les résultats contraires obtenus jusqu'ici s'expliquent par la très faible activité réactionnelle des paratuberculines employées.

Chez les cobayes paratuberculeux sensibilisés par des bacilles dans l'huile on obtient aussi des résultats qui montrent une toxicité réelle à leur égard de la paratuberculine homologue active. 5 cent. cubes injectés sous la peau en tuent, en moyenne, 50 p. 100 en moins de quarante-huit heures ; les survivants, très choqués, maigrissent énormément en quelques heures, et meurent le plus souvent, après plusieurs jours, d'infection secondaire. Avec une paratuberculine hétérologue la mort ne survient pas, mais tous les sujets éprouvés maigrissent et meurent parfois après quelques jours d'infection déclenchée par le choc.

Il est important de signaler que les paratuberculines actives ne sont pas toxiques pour les cobayes neufs par injection sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse (5 cent. cubes) ou même intracérébrale (4/10 de centimètre cube).

Désensibilisation par les paratuberculines actives.

12 cobayes tuberculisés, six semaines auparavant, par inoculation de 1/20.000 de milligramme de bacilles bovins virulents, souche G 7, et réagissant d'une manière nécrotique à la tuberculine, reçoivent pendant quinze jours une inoculation sous-cutanée de paratuberculine P (filtrat de culture en Sauton âgée de cinq mois) aux doses de :

	CENTIMÈTRES CUBES
Pendant les 3 premiers jours.	0,2
Pendant les 3 jours suivants.	0,5
Pendant les 3 jours suivants	1
Pendant les 3 jours suivants.	2
Pendant les 3 jours suivants.	5

Le seizième jour on injecte 10 cent. cubes, également par voie sous-cutanée.

Les premières injections déterminent un vif empâtement local avec nécrose limitée de la peau sus-jacente : tous les animaux maigrissent rapidement, 5 meurent au cours du traitement. Les 7 derniers sont éprouvés, par voie dermique, vingt-quatre heures après la dernière injection, avec 1/10 de centimètre cube de tuberculine brute au 1/10 et 0 c. c. 1 de paratuberculine P.

Résultats :

Avec la tuberculine : en vingt-quatre heures, léger empâtement rouge de 5 à 10 millimètres de diamètre sans nécrose centrale.

Avec la paratuberculine : au bout du même temps, petite papule de 4 à 10 millimètres de diamètre, à peine infiltrée et sans nécrose.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Weinzirl et Durward Thayer [27] qui ont réussi à désensibiliser des cobayes tuberculeux contre une épreuve mortelle pour les témoins par injection sous-cutanée d'un antigène extrait par l'eau physiologique de corps microbiens dégraissés de *Mycobacterium smegmatis*. Avec des paratuberculines inactives, A. Boquet, par contre, n'a obtenu que des résultats négatifs [28].

La désensibilisation peut aussi être réalisée chez des cobayes

allergisés par un bacille paratuberculeux en suspension dans l'huile de paraffine lorsqu'on leur injecte la paratuberculine homologue, à plusieurs reprises, et en quantités croissantes. C'est ainsi que 12 cobayes sensibilisés par une inoculation de 5 milligrammes de bacilles P dans l'huile par voie sous-cutanée et réagissant nécrotiquement à l'intradermo-paratuberculinisation homologue ont pu être désensibilisés presque totalement vis-à-vis de cette paratuberculine et d'une manière parfaite envers la tuberculine à la suite du même traitement que les animaux de l'expérience précédente. Eprouvés dans des conditions identiques, vingt-quatre heures après la dernière injection, ils n'ont présenté avec la paratuberculine homologue qu'un épaississement de la peau de 6 à 12 millimètres de diamètre avec rougeur centrale mais sans nécrose. La tuberculine a donné chez tous une réaction négative.

On voit donc que les paratuberculines, préparées par filtration sur papier de vieilles cultures lysées de certains bacilles paratuberculeux, jouissent, vis-à-vis des animaux tuberculeux, du même pouvoir réactionnel, toxique et désensibilisant que la tuberculine vraie. Mais du fait qu'elles possèdent une activité élective chez les animaux sensibilisés par les bacilles dont elles proviennent, on ne semble pas en droit de conclure qu'il existe une identité entre les substances actives contenues dans les paratuberculines et celles que renferme la tuberculine vraie. Grâce à leur haute teneur en protéides et surtout à la nature de certains de ces protéides, l'intensité des réactions para-allergiques qu'elles peuvent déclencher chez les tuberculeux atteint un degré équivalent à celui que possèdent les réactions allergiques spécifiques.

Il est, d'autre part, significatif que les produits résultant de la désintégration lente *in vitro* de certains bacilles paratuberculeux soient capables de déclencher des réactions nécrotiques chez les animaux sensibilisés par le germe homologue. On semble en droit de conclure de ce phénomène que l'hypersensibilité spécifique acquise peut jouer un rôle important dans l'apparition des lésions paratuberculeuses provoquées par des bacilles enrobés dans un corps gras à résorption lente ainsi que chez ceux qui reçoivent des inoculations répétées de corps microbiens tués.

Relations entre le pouvoir pathogène, les propriétés toxiques et les qualités sensibilisantes des bacilles acido-résistants.

En étudiant la toxicité des bacilles paratuberculeux, nous avons vu que les manifestations toxiques de ces germes peuvent se présenter sous deux types : effets immédiats ou primaires (mort rapide des cobayes inoculés par voie cérébrale avec des bacilles tués) et effets retardés ou secondaires (pneumonie toxique du lapin à la suite d'inoculations répétées de corps microbiens). Bien que distincts au premier abord, ces modes d'action toxique des bacilles paratuberculeux sont dans une interdépendance étroite. Se montrent seuls capables de donner naissance à la pneumonie toxique du lapin, les bacilles qui peuvent tuer le cobaye par une inoculation cérébrale et les plus toxiques par voie encéphalique sont aussi ceux qui tuent le lapin par injections répétées de faibles doses par voie veineuse. C'est seulement une différence de mécanisme d'action qui existe entre ces deux ordres de manifestations toxiques. Les effets secondaires de la toxicité paraissent dépendre, en partie au moins, de l'hypersensibilité acquise par suite de la présence de bacilles dans les tissus ; c'est ainsi qu'ils n'apparaissent que lorsque l'état allergique a eu le temps de s'installer. Les bacilles inoculés en suspension huileuse dont nous avons étudié le fort pouvoir allergisant sont aussi ceux qui donnent naissance aux lésions les plus étendues. Ces lésions demandent toujours un certain temps pour se constituer et surtout pour acquérir la très grande intensité qui les caractérise ; l'hypersensibilité ne peut également s'installer que quelques jours, au plus tôt, après l'inoculation des bacilles.

Mais s'il apparaît indéniable que l'allergie joue un rôle dans la formation des lésions paratuberculeuses tardives, il n'en est pas moins très probable qu'un autre mécanisme peut aussi intervenir, semblable à celui qui est mis en jeu dans les expériences de Ramon et de ses élèves [29] sur l' « immunisation concentrée ». On sait que cet auteur a désigné ainsi l'accrois-

sement de l'inflammation locale et des manifestations immunisantes qui en découlent lorsqu'un antigène est injecté par doses fractionnées en un même point du tégument. L'entretien de l'excitation, lié à une libération lente de substances toxiques, semble capable de déclencher, par une mise en jeu d'une sorte de « résonance biologique » des effets secondaires dont l'intensité apparaît hors de proportion avec la nature de l'excitant. C'est ce mécanisme qui peut expliquer, dans une certaine mesure, l'apparition de lésions nécrotiques très intenses autour des foyers où des bacilles, peu toxiques par eux-mêmes, se désintègrent lentement. Les produits de cette désintégration progressive constituent à la fois des substances irritantes et des allergènes. Hypersensibilité et excitation locale entretenues en découlent et seraient capables d'engendrer une réaction mésenchymateuse très vive. Bien entendu, il est possible que l'allergie elle-même ne soit qu'une manifestation de la « résonance biologique ».

Ce qui vient d'être dit sur le mécanisme de l'action pathogène dont jouissent artificiellement les bacilles acido-résistants saprophytes peut aussi s'appliquer aux propriétés pathogènes des bacilles tuberculeux. Lié d'une part au pouvoir toxique des corps microbiens et à la végétabilité de ces germes *in vivo*, la virulence du bacille de Koch ne doit pas être considérée, d'autre part, comme indépendante des qualités innées de l'hôte récepteur. S'il est manifeste que le sujet joue un rôle capital dans l'apparition des lésions paratuberculeuses tardives en étant plus ou moins apte, suivant ses qualités d'espèce, à se comporter comme un véritable résonateur biologique, il est encore plus évident que les qualités individuelles du « résonateur » entrent en jeu au cours des manifestations si diverses de l'infection tuberculeuse.

On ne doit pas oublier à ce point de vue les enseignements de la clinique qui, beaucoup mieux que les résultats de l'expérimentation, nous révèlent une prépondérance du terrain dans les infections chroniques type tuberculose. Sans doute, la présence dans les tissus de bacilles vivants constitue-t-elle le *primum movens* absolument nécessaire pour déclencher et entretenir une réaction tuberculeuse; mais la grande inconnue du problème consiste dans la réponse cellulaire, avec ses

modalités, ses fluctuations, son évolution qui dépendent de conditions organiques à peine entrevues jusqu'à présent.

Le facteur essentiel de la maladie tuberculeuse réside dans l'aptitude plus ou moins grande de l'individu à réagir contre une excitation toxique d'origine bacillaire et dans les fluctuations réactionnelles du sujet rattachées à sa constitution génétique, à son âge, à son mode de vie, à ses antécédents, au fonctionnement de ses glandes endocrines, à son sexe, aux variations saisonnières de l'organisme... L'analyse précise de ce facteur apparaît, hélas ! d'une bien plus grande complexité que la conception un peu simpliste d'une action directe d'un antigène hypothétique provenant des bacilles, libéré en plus ou moins grande abondance au sein des tissus et responsable à lui seul des altérations tuberculeuses ainsi que des modifications biologiques du milieu organique qui s'y rattachent.

Résumé et conclusions.

Il est possible de mettre en évidence, pour certaines souches de bacilles acido-résistants saprophytes, des qualités toxiques dont les manifestations peuvent suivre presque immédiatement l'inoculation de corps bacillaires tués (effets primaires) ou ne se produire qu'après une période de latence qui peut durer plusieurs semaines (effets secondaires ou tardifs).

Parmi les manifestations primaires se place, en premier lieu, l'encéphalite suraiguë mortelle qu'il est aisé de déclencher chez le cobaye par une inoculation intracranienne de corps microbiens tués de certains bacilles paratuberculeux à des doses variables suivant l'espèce. Dans le même ordre de faits se classent les altérations locales de la peau consécutives à une inoculation intradermique de cadavres bacillaires.

Les manifestations secondaires sont liées à l'entretien de l'excitation toxique provoquée *in situ* par les corps microbiens morts de certains bacilles paratuberculeux qui se désintègrent lentement. On peut les mettre en évidence chez les lapins, par injections intraveineuses répétées de bacilles tués à des doses modérées, variables suivant la souche. En trois semaines, en moyenne, il se constitue des lésions pneumoniques intenses

consistant en l'oblitération massive de la majorité des alvéoles pulmonaires par un exsudat fibrino-cellulaire où les histiocytes et les lymphocytes prédominent. Ces lésions s'accompagnent d'endo-vascularite oblitérante portant sur les vaisseaux de moyen et de petit calibre. L'intensité des altérations pulmonaires est telle qu'elle entraîne, le plus souvent, la mort par obstacle mécanique à la respiration.

A côté des propriétés toxiques des bacilles paratuberculeux, il y a lieu de considérer le pouvoir sensibilisant de ces germes. On peut le mettre en évidence d'une manière particulièrement nette par inoculation de bacilles enrobés dans de l'huile de paraffine (procédé de Thomson). Dans ces conditions, il se développe en quelques jours un état d'allergie intense qui possède des caractères de spécificité assez étroits pour le germe sensibilisant.

Les épreuves d'allergie sont considérablement facilitées par l'emploi de paratuberculines très actives. S'il est établi, depuis longtemps, que les cultures en milieu liquide des bacilles acido-résistants saprophytes contiennent des substances réactionnelles manifestant des propriétés analogues à celles de la tuberculine pour l'homme et les animaux tuberculeux, on s'accordait à reconnaître que l'activité des paratuberculines était toujours moindre que celle de la tuberculine. Il ressort de nos recherches que la valeur d'une paratuberculine dépend de l'âge de la culture et de l'aptitude de la souche qui lui donne naissance à présenter des phénomènes d'autolyse révélés par la dégénérescence granuleuse des éléments bacillaires, la perte de leur acido-résistance et la libération progressive de protéides dans les milieux.

Les cultures lysées de certaines souches peuvent contenir, après plusieurs mois de séjour à 37°, des paratuberculines dont l'activité réactionnelle se rapproche de celle de la tuberculine vraie. Elles possèdent notamment des pouvoirs toxiques et désensibilisants, pour les cobayes tuberculeux, équivalents à ceux de la tuberculine vraie. Par contre, ces paratuberculines jouissent, quelle que soit leur teneur en protéides, d'une activité spécifique pour les animaux sensibilisés par les bacilles dont elles proviennent. Il n'y a donc pas identité entre les substances actives contenues dans les paratuberculines et celles

que renferme la tuberculine vraie. Les réactions obtenues chez les sujets tuberculeux avec des paratuberculines doivent être rapportées à l'état d'hypersensibilité non spécifique que ces sujets ont acquis, du fait de leur infection, envers certains protides microbiens.

Jouissant de qualités toxiques, en particulier étant capables de déclencher dans un organisme vulnérable des réactions progressives intenses par désintégration lente dans les tissus, la plupart des bacilles paratuberculeux peuvent aussi, à des degrés divers, sensibiliser l'hôte envers les produits libérés par les bacilles au cours de leur dégénérescence *post mortem*. Il est logique de penser que les qualités allergisantes jouent un rôle dans les manifestations secondaires de la toxicité. Selon toute vraisemblance, c'est aussi sous la dépendance des pouvoirs toxiques et sensibilisants que se placent les propriétés pathogènes que l'on peut mettre en évidence par des artifices de l'expérimentation chez de nombreuses espèces de bacilles acido-résistants saprophytes.

L'analyse des rapports entre les qualités toxiques et allergisantes et le pouvoir pathogène expérimental des bacilles paratuberculeux permet de pénétrer plus avant dans le mécanisme de certaines manifestations de la virulence des bacilles acido-résistants pathogènes, type bacille de Koch.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Laporte (R.). Ces *Annales*, **65**, 1940, p. 282.
[2] Alexa. *Thèse de Sciences*, Paris, 1928, Jouvet et Cie, édit.
[3] Cantacuzène. *Congrès international de la Tuberculose*, **1**, 1905, p. 158.
[4] Boquet (A.) et Broca. Ces *Annales*, **55**, 1935, p. 8.
[5] Bablet, van Deinse et Schwartz. *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, p. 350.
[6] Bertrand, Bablet et Bloch. *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, p. 993.
[7] Borrel, Boez et Coulon. Ces *Annales*, **37**, 1923, p. 1012.
[8] Ledoux-Lebard. Ces *Annales*, **14**, 1900, p. 535.
[9] Irimescu. *C. R. Soc. de Biol.*, **59**, 1905, p. 385.
[10] Lange (Br. et E.). *Deut. Med. Woch.*, 1922, p. 248.
[11] Dietrich. *Deut. Med. Woch.*, 1921, p. 406.
[12] Boquet (A.) et Nègre. *C. R. Soc. de Biol.*, **91**, 1924, p. 337 ; Ces *Annales*, **40**, 1926, p. 11.
[13] Crawford. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **69**, 1926, p. 579.

[14] Long. *Am. Rev. of Tub.*, **9**, 1924, p. 215.
[15] Thomson. *Am. Rev. of Tub.*, **26**, 1932, p. 162.
[16] Harris et Schattenberg. *Proceed. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **39**, 1938, p. 122.
[17] Laporte (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **132**, 1939, p. 420.
[18] Van Deinse. *C. R. Soc. de Biol.*, **132**, 1939, p. 358.
[19] Boquet (A.) et Laporte (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935. p. 1038.
[20] Roemer. *Berl. Klin. Woch.*, 1891, p. 1189.
[21] Buchner. *Münch. Med. Woch.*, **38**, 1891, p. 841.
[22] Klemperer. *Zeitsch. f. Klin. Med.*, **20**, 1892, p. 165.
[23] Selter. *Deut. Med. Woch.*, 1922, p. 54 et 686 ; *Beitr. z. Klin. d. Tuberk.*, **55**, 1923, p. 318. — Selter et Tancre. *Zeitsch. f. Tuberk.*, **35**, 1922, p. 171.
[24] Bordet (P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **106**, 1931, p. 1251 et **107**, 1931, p. 1465.
[25] Sorgo. *Deut. Med. Woch.*, 1911, p. 1015.
[26] Laporte (R.). Ces *Annales*, **53**, 1934, p. 598.
[27] Weinzirl et Durward Thayer. *Tubercle*, 1930-1931, p. 488.
[28] Boquet (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **110**, 1932, p. 165.
[29] Ramon et Lemétayer. *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 909 ; *Rev. d'Immunol.*, **3**, 1937, p. 505.

LA RECHERCHE DU TEST DE PROTECTION DE LA SOURIS ET L'EXAMEN HISTOLOGIQUE DU FOIE ENVISAGÉS COMME INDICATEURS DANS L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA FIÈVRE JAUNE

par J. BABLET.

(*Institut Pasteur.*)

Dans un mémoire publié en novembre 1937 par ces *Annales*, nous avons essayé de préciser dans quelles conditions peut s'exercer le contrôle histologique de la fièvre jaune qui nous avait été confié pour l'Afrique française par le Ministère des Colonies en 1934.

Le dépistage des cas frustes ou isolés ou atypiques de fièvre jaune est en effet d'une grande importance au point de vue épidémiologique et justifie les mesures prises par les autorités médicales pour entourer du maximum de garanties l'établissement du diagnostic.

Grâce à la générosité de la Fondation Rockefeller, nous avons eu la bonne fortune de pouvoir étudier récemment sur place l'organisation antiamarile du Brésil et de nous rendre compte de la valeur des résultats que peut fournir une prospection méthodique et complète de la zone intertropicale sud-américaine où l'aire de dispersion de la fièvre jaune n'avait pas encore été fixée.

L'activité féconde du Service coopératif antiamaril, qui réunit dans une heureuse formule de collaboration les techniciens de la Fondation Rockefeller et les autorités locales, a mis en évidence au Brésil des formes insoupçonnées de fièvre jaune. Les notions épidémiologiques antérieurement admises ont dû être révisées. La conservation du virus dans des zones presque désertiques de l'intérieur suppose en effet l'intervention d'animaux sauvages — dont la détermination se pour-

suit — et d'insectes vecteurs nouveaux. La possibilité de l'infection humaine se trouve alors subordonnée à des conditions encore mal connues et risque, lorsqu'elle se réalise dans des régions éloignées de tout contrôle médical, de passer inaperçue jusqu'au jour où la réunion fortuite de facteurs favorables déclenche une épidémie meurtrière (1).

Les seules méthodes d'investigation permettant de pénétrer les mystères de ces zones silencieuses sont l'examen systématique des foies prélevés par viscérotomie dans tous les cas de décès suspects et, d'autre part, la recherche méthodique du test de protection dans le sérum des habitants de telles régions.

Ces méthodes ont fait leurs preuves et il ne devrait plus être nécessaire de les recommander ni d'en affirmer l'utilité pratique. Cependant un certain nombre de personnalités médicales ont émis des doutes sur leur valeur et ne semblent pas disposées à admettre qu'il s'agit, pour la détection de la fièvre jaune, de véritables « indicateurs » (Soper), capables de guider l'hygiéniste et de l'autoriser à prendre à bon escient les mesures sanitaires susceptibles d'arrêter la diffusion d'une maladie redoutable.

En Afrique française, plusieurs enquêtes sérologiques entreprises avec le concours de la Rockefeller Foundation avaient singulièrement élargi l'aire de dispersion de la fièvre jaune dès 1934 en dévoilant une forte proportion de tests positifs dans des régions du bassin du Congo et de l'Oubangui où le diagnostic clinique de fièvre jaune n'avait jamais été posé. La recherche systématique de l'hépatite amarile dans tous les cas de maladie fébrile ayant entraîné la mort en moins de dix jours a montré depuis 1935 la haute valeur de cette première indication en révélant, dans ces mêmes régions, l'existence de lésions typiques autorisant le diagnostic histologique de fièvre jaune dans des cas cliniquement suspects. Et l'isolement du virus par le laboratoire est venu, dans le seul cas où il a pu être tenté, confirmer, de façon péremptoire, la valeur du diagnostic histologique.

(1) La fièvre jaune dite de brousse peut d'ailleurs être observée à proximité des villes. Des cas ont été constatés en 1937 à une demi-heure d'auto de Sao-Paulo et, en 1938, à la même distance de Rio.

L'étude de ces cas sporadiques de fièvre jaune, observés dans des agglomérations urbaines ou dans des postes isolés est, au point de vue épidémiologique, d'une telle importance que nous croyons utile de publier ci-dessous les quelques observations déjà recueillies dans l'espoir de convaincre les incrédules et d'attirer l'attention des médecins et hygiénistes incomplètement informés sur la valeur pratique des procédés de détection de la fièvre jaune.

Observations I à IV. — Nous ne nous étendrons pas sur les 4 cas observés en 1937 à Libreville et Port-Gentil sur la Côte du Gabon. Ils concernaient des Européens et se présentaient, au point de vue clinique et au point de vue histologique (2), comme des fièvres jaunes typiques. Trois d'entre eux se sont succédé du 8 février au 14 mars, dans l'espace de cinq semaines et doivent être interprétés comme une courte bouffée épidémique prolongée jusqu'au 28 juillet par un quatrième cas. Ce dernier toutefois n'est pas d'origine urbaine et se rapporte à une femme de quarante et un ans vivant en pleine brousse, à 40 kilomètres de Libreville, dans la région de Chinchoua, à l'embouchure de la Komoë, sur un chantier de coupeur de bois. Le virus amaril paraît donc implanté dans l'intérieur du Gabon (sous la forme de virus de brousse) comme aussi dans les ports de la côte (Port-Gentil, Libreville, Pointe-Noire) où quelques cas surviennent, soit isolément et à longs intervalles, soit groupés en quelques semaines comme les 3 cas de février-mars 1937. S'agit-il d'un virus local ou d'un virus d'importation ? La question est sans intérêt puisque l'infection amarile sévit à l'état endémique au Gabon. Le pourcentage de tests de séro-protection positifs indiqué par Stefanopoulo varie de 10 à 30 p. 100 suivant les localités.

Observation V. — Dans le cas de M. Monv..., receveur des postes à Brazzaville, non vacciné contre la fièvre jaune, mort le 19 avril 1937, les signes cliniques (fièvre élevée, anurie précoce, albuminurie, vomissements noirs, ictère tardif) et l'examen nécropsique plaidaient en faveur de la maladie amarile. L'examen histologique du foie révélait les lésions typiques de l'hépatite amarile. Et bientôt l'Institut Pasteur de Brazzaville, qui avait prélevé du sang dès le début de la maladie, réussissait à y mettre en évidence le virus. Il s'agissait donc bien d'un cas authentique de fièvre jaune bien qu'il n'ait été précédé, ni suivi, à un an d'intervalle, d'aucun autre cas.

Les mesures sanitaires adéquates avaient été prises d'ailleurs de bonne heure pour limiter les risques de propagation et l'entourage fut soumis à une surveillance médicale sévère et prolongée.

L'enquête épidémiologique (3) révéla que M. M... avait dû être conta-

(2) Tous les examens histologiques se rapportant aux cas de fièvre jaune ci-dessous décrits ont été faits par moi-même au laboratoire des Instituts Pasteur coloniaux.

(3) Cazanove. Etude sur un cas de fièvre jaune observé à Brazzaville. *Ann. Méd. et Pharm. colon.*, 1937, p. 625-648.

miné au bureau de poste même — où les stégomyies étaient assez nombreux et agressifs en fin de journée — et que le porteur de virus ne pouvait être qu'un commerçant haoussa récemment revenu de la Côte d'Ivoire et qui avait été malade à son arrivée à Brazzaville. Cet indigène, passé au Congo Belge, ne put être retrouvé.

Il s'agissait donc vraisemblablement, dans ce cas isolé, de virus importé d'Afrique occidentale et transmis à la faveur de circonstances exceptionnelles dans une ville où sa diffusion s'est trouvée immédiatement limitée par les mesures prophylactiques et par les conditions atmosphériques peu favorables à la pullulation stégomyienne.

Rappelons qu'en 1935-1936, l'enquête de Stefanopoulo sur les tests de protection en A. E. F. avait révélé, dans les villages indigènes autour de Brazzaville, une proportion élevée de sérums positifs (12 à 40 p. 100).

Observation VI. — Le cas de M. Psi..., sujet grec, trente-six ans, mort à l'hôpital de Bangui le 14 septembre 1937 est assez spécial car cet homme mourut le jour même de son arrivée dans un état comateux et en hypothermie. Néanmoins l'observation clinique notait des vomissements noirs, de l'ictère et une forte albuminurie. La nécropsie montra un foie dégénéré et un estomac rempli de liquide à grumeaux noirs semblable à du marc de café.

L'examen histologique des organes prélevés permettait de conclure à « *une hépato-néphrite chronique sur laquelle se greffaient des lésions toxi-infectieuses aiguës du type habituellement observé dans la fièvre jaune* ».

Or, la fièvre jaune n'avait pas jusqu'alors été signalée dans l'Oubangui-Chari, que son éloignement de la mer met à l'abri des virus importés d'Afrique occidentale. L'enquête sérologique de 1933-1936 faite par les soins de la Rockefeller Foundation avait cependant signalé d'assez forts pourcentages de tests de protection positifs dans la région de Bangui.

Comme M. Psi... vivait dans la brousse au milieu des indigènes, il semble bien qu'il ait été victime d'un virus local analogue à ceux que F. Soper a mis en évidence dans l'hinterland brésilien, parfois à proximité de grands centres urbains. Quelques mois plus tard, d'ailleurs, ce même virus faisait une nouvelle victime à Bangui.

Observation VII. — La courte maladie à laquelle succomba M. Mod..., sujet grec habitant Bangui, le 6 janvier 1938, devait faire soupçonner la fièvre jaune (albuminurie, vomissements marc de café). L'examen histologique mettant en évidence la stéatose et de nombreuses cellules globuleuses en chromatolyse nucléaire, concluait en faveur de l'hépatite amarile.

La contamination semble avoir eu lieu en brousse, M... ayant fait une excursion aux chutes de Boali, aux environs de Bangui, le 1er janvier, cinq jours avant les premiers symptômes de la maladie. Sans doute s'agit-il d'un cas de « Jungle Yellow Fever » comme le précédent. Bien que des gîtes à stégomyies du type aedès aient été repérés dans la case même du défunt, la surveillance sanitaire exercée sur l'entourage ne révéla par la suite aucune affection suspecte.

Observation VIII. — La maladie de M. Raf..., mort à Mobaye (Oubangui-Chari) le 2 novembre 1937, débuta le 27 octobre par des frissons

et de la fièvre (40°8). La température se maintint en plateau pendant quatre jours, accompagnée de délire, de vomissements et d'expectoration sanguinolente. Le 1er, la fièvre baisse (39°) et l'état général est meilleur, mais le 2 la mort survient après une crise tétaniforme.

L'autopsie, incomplète, a permis de constater qu'il n'y avait pas de sang dans l'estomac et que la rate était hypertrophiée.

Nous citons intégralement le résultat de l'examen histologique : « L'infiltration graisseuse, en fines gouttelettes, intéresse à des degrés divers la presque totalité des éléments cellulaires, peu dissociés et ayant conservé, pour la plupart, leur aspect normal. Il existe cependant des cellules globuleuses en nécrobiose évidente et à noyau en chromatolyse. Infiltration discrète du lobule et des espaces porte où les endothéliums biliaires sont très irrités. Pigment noir disséminé. »

Malgré la discrétion des lésions, leur aspect et leur topographie les rapprochent du tableau habituel de l'hépatite amarile. Peut-être s'agit-il d'un cas fruste (fièvre jaune de brousse) ayant succombé en raison de son mauvais état général antérieur (4). M. R... était atteint de prostatite.

Il résulte de l'enquête faite sur place par le médecin général Cazanove que la maladie à laquelle succomba M. Raf... sévit depuis quelques années chez les indigènes de la région sous la forme épidémique et a jusqu'à ce jour été étiquetée grippe. Les symptômes pulmonaires seraient prédominants dans cette affection où l'expectoration sanglante serait constante. D'autre part, cette maladie d'importation aurait coïncidé avec la multiplication des rats attirés par la culture intensive du coton. Y a-t-il un lien entre les deux constatations ? M. Cazanove se contente de poser la question.

Quoi qu'il en soit, le diagnostic de fièvre jaune, formellement indiqué par les résultats de l'examen histologique et non infirmé par l'observation clinique, peut encore s'appuyer sur les pourcentages positifs importants de tests de séro-protection officiellement constatés dans la région de Mobaye.

Observation IX. — Le 7 novembre 1938, M. Bor..., agent de la Compagnie minière mourait à Sosso, petit village de la Haute-Sangha, à 55 kilomètres au sud de Berbérati, à 200 kilomètres à l'ouest de Bangui, après trois jours de maladie où avaient été notés de la fièvre, dépassant 40°, de *l'anurie*, des vomissements, des *selles hémorragiques* et de l'ictère terminal.

Cet agent, non vacciné contre la fièvre jaune, était arrivé de France trois semaines auparavant.

Le foie, de coloration jaune à l'autopsie, présentait, à l'examen histologique, les lésions de l'hépatite amarile.

L'enquête épidémiologique révéla la présence de quelques gîtes de stégomyies dans le village indigène de Sosso et de gîtes plus nombreux autour des deux habitations des Européens. *Aucun cas de maladie suspecte* ne fut observé dans l'entourage. Trois décès qui avaient eu lieu parmi les travailleurs indigènes de la Compagnie minière peu de temps auparavant avaient été attribués à des affections pulmonaires. Il semble que le virus rural soit en cause.

(4) Le diagnostic d'hépatite amarile a été confirmé par le Dr E. Villela, pathologiste des laboratoires de la fièvre jaune à Rio de Janeiro.

Observation X. — Le sergent Man... mourait le 8 octobre 1937 à Mora, petit poste de montagne du Cameroun, situé à 70 kilomètres de Maroua, chef lieu de la province du Logone et à 150 kilomètres environ de Dikoa (Nigéria). Son observation clinique notait une *fièvre élevée* résistant à la quinine, de *l'albuminurie* et des *vomissements*

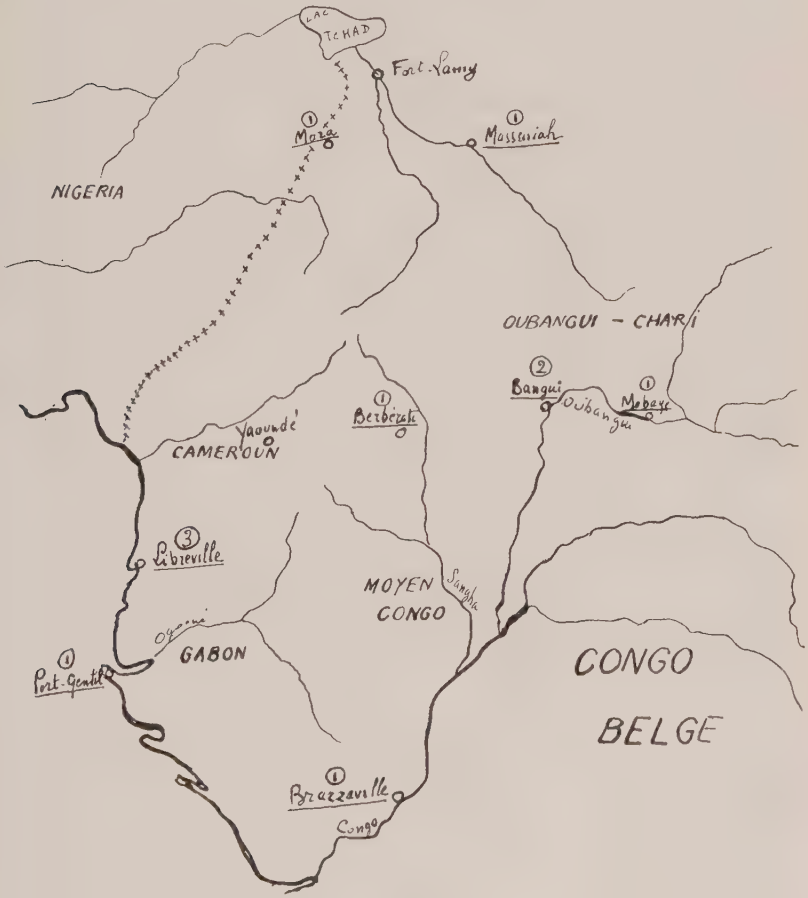


Fig. 1. — Carte de la partie de l'Afrique équatoriale française où ont été observés les 11 cas de fièvre jaune décrits. Un trait souligne le nom des localités habitées par les malades. Le chiffre voisin indique le nombre de cas observés.

noirs. L'examen histologique du foie montrait une hépatite toxi-infectieuse du type amaril.

C'était le premier cas identifiable à la fièvre jaune survenu au Cameroun dans une région où cependant de nombreux tests de protection positifs avaient été relevés en 1933. Le poste, où ne vivaient

que trois Européens, n'a jamais présenté d'autres cas suspects avant ni après la mort du sergent Man... Celui-ci habitait une case isolée avec une femme indigène. Rentré de tournée depuis donze jours, il n'a pu être contaminé que sur place.

En raison de la proximité de la frontière de Nigéria où la fièvre jaune est également endémique, il est impossible d'affirmer qu'il s'agissait d'un virus local, bien que la saison ne fût guère favorable aux échanges ni aux transports sur route.

Observation XI. — Le 13 janvier 1939 mourait, à l'hôpital de Fort-Lamy (Tchad), M^me^ Is... non vaccinée contre la fièvre jaune et qui avait été évacuée de Massenya (Baguirmi) pour hyperthermie le 9 janvier. Le début de la maladie se situait au retour d'une tournée d'un mois effectuée en compagnie de son mari, administrateur, dans le sud de la province du Baguirmi, sur les bords du Chari.

Dans les antécédents, on notait une intervention pour rétroversion utérine avec pyélonéphrite pendant la convalescence et plusieurs récidives par la suite. La victime était, cependant, au dire de son mari, en parfaite santé au moment où elle partit en tournée.

La maladie qui l'emporta présentait avec la fièvre jaune des analogies troublantes, fièvre élevée en plateau, rémission nette au cinquième jour, oligurie puis anurie, albuminurie, hémorragies gastriques à sang rouge puis noir, ictère tardif. La nécropsie montrait un foie de coloration jaune chamois et un estomac bourré de caillots noirs, un rein petit et congestionné, une vessie vide.

L'examen histologique ne permettait pas de douter du diagnostic, les lésions du foie étant du type amaril classique.

La contamination ne pouvait avoir eu lieu que dans la brousse où les moustiques étaient, paraît-il, nombreux en cette saison. Mais M^me^ Is... faisait toujours la sieste sous moustiquaire et se servait de flytox. Son mari qui était sur le point de prendre sa retraite après une longue carrière coloniale ne se protégeait guère contre les piqûres de moustiques et n'a présenté aucun trouble, non plus qu'aucun membre de l'entourage.

Il est vraisemblable qu'il s'agissait d'un virus de brousse, contre lequel joue une certaine immunité acquise chez les indigènes et les Européens installés depuis longtemps dans la région.

L'existence de lésions rénales antérieures peut avoir exercé une influence aggravante sur l'évolution de ce cas de typhus amaril.

Conclusions.

Sur une carte de l'Afrique équatoriale, reportons l'indication des localités où ont été observés les 10 cas de fièvre ictérigène suspecte dont nous venons de parler.

Port-Gentil et *Libreville* (4 cas) sur la Côte du Gabon et *Brazzaville* (1 cas) relié à cette côte par un chemin de fer peuvent être infectés par des porteurs de virus venus par courrier maritime des ports du Dahomey, de la Côte d'Ivoire,

de la Nigéria en quatre ou cinq jours. C'est à cette conclusion qu'aboutit l'enquête épidémiologique faite par le médecin général Cazanove sur le cas de Brazzaville. Les recherches sérologiques de Stéfanopoulo (1933) ont montré une proportion élevée de tests de protection dans les villages indigènes avoisinant ces villes (plus de 20 p. 100). Le virus de la fièvre jaune existe à l'état endémique dans ces régions, et s'il ne détermine pas de véritables épidémies, il faut surtout en rechercher la cause dans la faiblesse de l'indice stégomyien.

Bangui, ville importante sur la rive droite de l'Oubangui, occupe une position centrale dans l'hinterland congolais, séparée de l'Océan Atlantique à l'Ouest, de Brazzaville au Sud et du Lac Tchad au Nord par une distance de 1.000 kilomètres environ. Deux cas y ont été observés. Deux autres l'encadraient, l'un provenant de Mobaye, situé à 200 kilomètres à l'Est, également sur l'Oubangui, et l'autre de la région de Berbérati, poste administratif à 200 kilomètres à l'Ouest.

Or, dans toute cette région de la Haute-Sangha et de l'Oubangui-Chari, de forts pourcentages positifs de tests de séro-protection contre la fièvre jaune ont été constatés en 1931-1933. Il y avait donc là vraisemblablement une zone silencieuse où la maladie n'avait pas encore été signalée mais où la viscérotomie systématique a permis de la mettre en évidence. Il semble qu'au point de vue épidémiologique il s'agisse de la forme désignée par Soper sous le nom de fièvre jaune de brousse, ce qui suffit à expliquer son faible pouvoir de diffusion.

Enfin, 2 cas de fièvre jaune clinique et histologique ont été repérés à proximité de l'embouchure du Chari dans le Lac Tchad, dans une région considérée comme indemne de typhus amaril. Cette région du bas Chari a été explorée au point de vue sérologique entre 1931 et 1936 et de nombreux tests de protection positifs y ont été signalés (Stefanopoulo : 50 p. 100 à Massenya en 1935). La proximité de la Nigéria où de nombreux cas de fièvre jaune sont observés chaque année permet de suspecter des importations de virus, tout au moins dans la zone du Cameroun voisine de la frontière où se trouve Mora. La même éventualité peut être envisagée en ce qui concerne le Baguirmi, avec moins de vraisemblance

toutefois, et le virus qui a contaminé Mme Is... au cours d'une tournée et n'a pas fait d'autres victimes doit être rangé, en l'absence de renseignements épidémiologiques précis, dans le groupe des virus de brousse.

Au point de vue clinique, les 10 cas observés en A. E. F. pouvaient être interprétés comme fièvre jaune, celui de M. Raf..., mort à Mobaye, étant le plus douteux. L'examen histologique du foie concluait nettement en faveur de l'hépatite amarile pour les 9 cas cliniquement suspects et se montrait seulement un peu moins affirmatif pour le dernier.

Le contrôle expérimental, par inoculation directe du sang du malade à un animal sensible, a obtenu l'isolement du virus dans le seul cas, celui de Brazzaville, où la proximité d'un Institut Pasteur ait permis de le tenter.

Dans l'état actuel de nos connaissances, la collaboration de la clinique et du laboratoire autorise à conclure fermement en faveur de la fièvre jaune pour ces 10 cas bien que le virus n'ait été isolé qu'une seule fois. A l'appui de cette conclusion viennent d'ailleurs les résultats des enquêtes faites sur le test de séroprotection dans les régions où ont été observés les cas étudiés ci-dessus.

Les enquêtes sérologiques poursuivies en A. E. F. sur l'instigation et avec le concours de la Fondation Rockefeller de 1931 à 1935 ont en effet indiqué de forts pourcentages positifs dans les régions de Libreville, Brazzaville, Mora, Berbérati, Bangui, Mobaye et Massenya. On pouvait en inférer que la fièvre jaune avait déjà sévi dans ces régions, il était à prévoir qu'elle y réapparaîtrait.

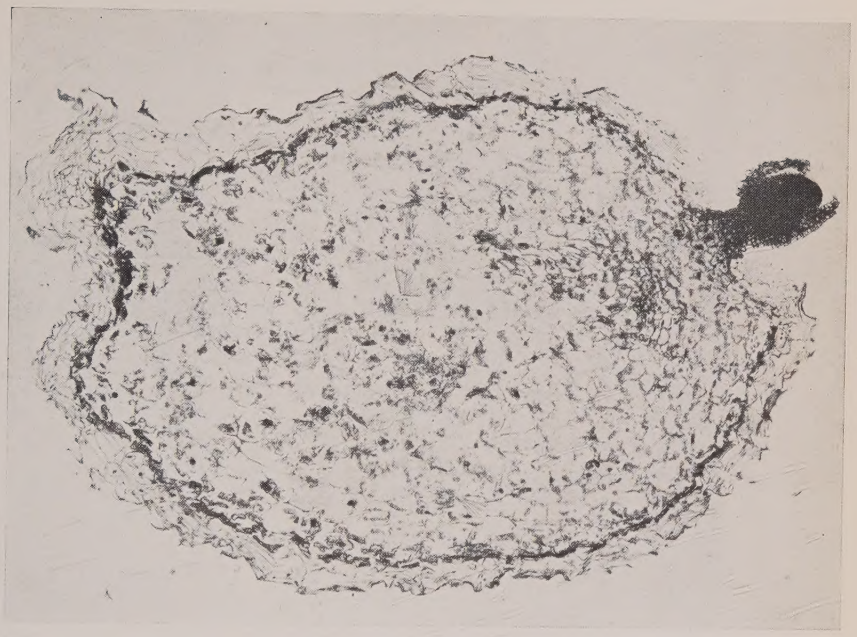
Une telle concordance entre les renseignements fournis par la viscérotomie et la recherche du test de protection de la souris doit lever tous les doutes sur la valeur intrinsèque de ces deux indicateurs de fièvre jaune et doit inciter les gouvernements intéressés à en multiplier l'emploi dans les zones silencieuses.

Le Gérant : G. Masson.

Imprimé par l'Ancne Impie de la Cour d'Appel, A. Maretheux, Dir.,
1, r. Cassette, à Paris (France).

PLANCHE I.

MASSON ET Cie, ÉDITEURS



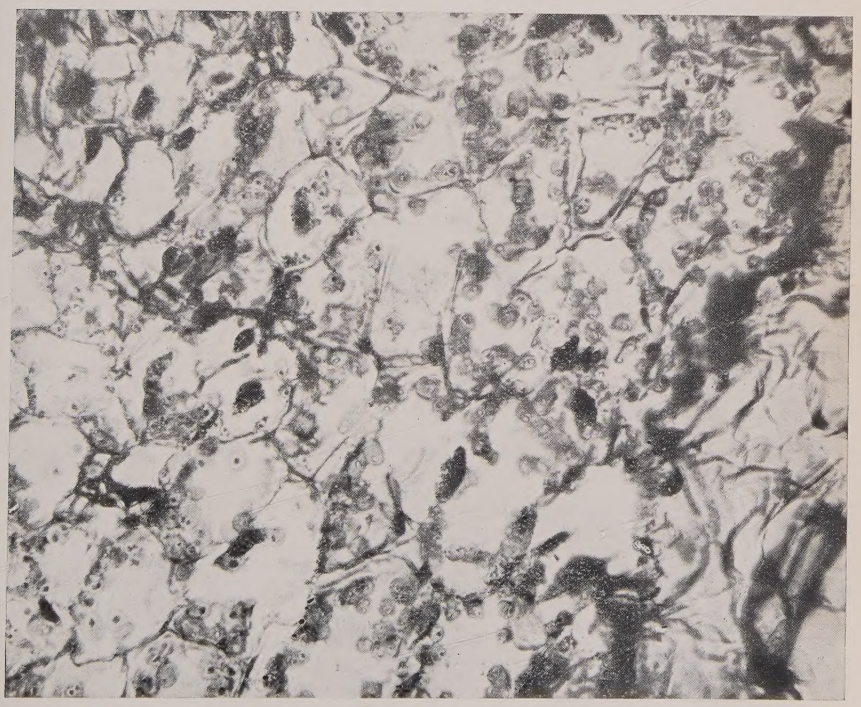


Planche II.